

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS-BIOQUÍMICA

ANNA PAULA BRANDT

**DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL E CITOTOXICIDADE DA SIDNONA
SYD-1 EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2)**

CURITIBA
2016

ANNA PAULA BRANDT

**DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL E CITOTOXICIDADE DA SIDNONA
SYD-1 EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2)**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do
grau de Doutora em Ciências-Bioquímica, no programa de
Pós-graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Dra. Silvia Maria Suter Correia Cadena

Co-orientadora: Dra. Amanda do Rocio Andrade Pires

Colaboradora: Dra. Julie St-Pierre

CURITIBA
2016



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)
Código CAPES: 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **ANNA PAULA BRANDT**, intitulada: **"Disfunção Mitocondrial e Citotoxicidade da Sydnona SYD-1 em Células de Hepatocarcinoma Humano (HepG2)"**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

CURITIBA, 26 de Outubro de 2016.


SILVIA MARIA SUTER CORREIA CADENA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


ALEXANDRA ACCO
Avaliador Externo (UFPR)


GLAUCIA REGINA MARTINEZ
Avaliador Interno (UFPR)


SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER
Avaliador Interno (UFPR)


ALEXANDRA SUSANA LATINI
Avaliador Externo (UFSC)

*À minha mãe Neiva Brandt
que é a luz da minha vida.
Ao meu pai (in memoriam)
que mesmo ausente está sempre em meu coração*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora, por toda a proteção durante esse tempo vivendo longe dos meus, por ouvirem minhas angústias mais profunda e por acalmarem meu coração nos momentos mais difíceis. Obrigada pela força necessária para sempre seguir em frente e nunca desistir e por colocar pessoas especiais no meu caminho que deixaram e deixam a minha vida mais leve e feliz.

À minha mãe, agradeço de todo meu coração. Obrigada por ser sempre o meu porto seguro, pelas palavras doces, pelos abraços apertados, por secar minhas lágrimas mesmo não conseguindo conter as suas, por ser exemplo de força e persistência, por me amar e acreditar em mim incondicionalmente, enfim, por cada pequena coisa que você fez para que eu seguisse sempre em busca dos meus sonhos. Todas as minhas conquistas eu dedico a você, para te proporcionar orgulho e alegria e em agradecimento por tudo que continua fazendo, nunca pedindo nada em troca, somente querendo minha felicidade. Eu não conseguiria sem você.

À minha família que mora no Canadá, meu tio Vilceu, minha tia Márcia e meus primos Fábio, Jean e Pedro. Obrigada por terem me recebido com tanto carinho, por toda ajuda nos difíceis primeiros meses de adaptação e por cada momento vivido junto a vocês.

À professora Sílvia minha orientadora e minha “mãe científica”. Eu tenho tanto a te agradecer. Obrigada por sempre confiar em mim e no meu potencial, mesmo eu mesma não acreditando. Pelas palavras certas nos meus vários momentos de desespero. Pela oportunidade de viver novas culturas. Por dividir comigo todo o teu conhecimento, por me incentivar, por acreditar e respeitar minhas idéias, por confiar a mim a responsabilidade de implementar novos protocolos, por toda a compreensão durante os seis anos que trabalhamos juntas, pelos lanches, marmitas e cafés, pelos abraços, enfim por estar sempre ao meu lado. Eu jamais vou esquecer de você e de todos os momentos vividos no teu laboratório. Que Deus te abençoe sempre.

À minha co-orientadora Amanda por toda a ajuda nos protocolos e experimentos, pelas discussões e correções dos trabalhos e por todo incentivo.

As demais professoras do grupo por estarem sempre dispostas a ajudar, em especial à Gláucia e Sheila pelas correções dos projetos e relatórios que culminaram nesse trabalho, e a Maria Eliane pela preocupação e conforto emocional.

À professora Julie St-Pierre, minha orientadora no Canadá pela oportunidade de estar em seu laboratório e por ter me recebido de forma tão gentil, bem como aos meus colegas Shawn, Sylvia, David, Simon and Valérie por toda ajuda, pelos cafés e momentos de distração, por me mostrarem um pouco da sua cultura e principalmente pela paciência. Thanks so much!

À todos os meus colegas de turma e do laboratório de oxidações pelo entendimento, paciência e conforto que somente aqueles que vivem o mesmo momento podem oferecer, em especial as amizades que se fortaleceram além do laboratório e que eu vou levar sempre dentro do meu coração: Gustavo, Marília, Aninha, Diego, Stephane, Monique, Tassiele, Lucimara, Juliana Amorim e Carol Lane.

Ao Otávio pelos experimentos de Western Blotting, obrigada!

A Pós-Graduação em Bioquímica pela oportunidade bem como as agências financiadoras Capes, CNPq e INCT-Redoxoma pelo auxílio financeiro.

"A persistência é o menor caminho do êxito"
Charles Chaplin

"Uma mente que se abre para uma nova idéia jamais volta ao tamanho original"
Albert Einstein

RESUMO

Diferentes atividades biológicas têm sido atribuídas aos compostos mesoiônicos. Para a sidnona SYD-1 (3-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazolio-5-olato) foi descrita significativa atividade antitumoral contra Sarcoma 180, carcinoma de Erlich e Walker-256. Neste estudo foram avaliados os efeitos do SYD-1 em células de hepatocarcinoma humano (HepG2), considerando sua elevada taxa de mortalidade e a existência de apenas um quimioterápico para o seu tratamento. Os efeitos do mesoiônico foram avaliados em células cultivadas em meio DMEM alta glucose (AG) e DMEM sem glucose e com galactose/glutamina (GAL) para direcionar o metabolismo destas células para a via glicolítica e fosforilação oxidativa, respectivamente. Ainda, com o fim de estabelecer uma possível seletividade, alguns ensaios também foram realizados em hepatócitos de rato em cultura mantidos em meio DMEM AG. SYD-1 reduziu de forma concentração dependente a viabilidade das células HepG2, avaliada por quatro metodologias diferentes. Pelo método do MTT, as reduções foram de ~22% e ~49% para 50 μ M de SYD-1, para células cultivadas em meio AG e GAL, respectivamente. Resultado similar foi obtido com a coloração com cristal violeta e atividade da enzima LDH no meio extracelular. No entanto, nenhum efeito foi observado utilizando a metodologia de exclusão do azul de tripan. Todos os estados da respiração (basal, *leak* e desacoplado), em células cultivadas, foram inibidos após o tratamento das células HepG2 com SYD-1 (25 e 50 μ M), sendo mais acentuado o efeito nas culturas mantidas em meio GAL. Nas mesmas condições, foi observada a diminuição nos níveis celulares de ATP (~29%). Os níveis de piruvato, por sua vez, diminuíram nas células tratadas com 50 μ M do SYD-1, com consequente aumento dos níveis de lactato. Em células cultivadas em meio AG, SYD-1 (50 μ M), após 24h de tratamento, também foi capaz de aumentar a expressão de PGC1 β e reduzir a expressão de PGC1 α . Após 72h de tratamento, com a mesma concentração de SYD-1, houve um aumento na expressão de PGC1 α , bem como seus alvos *downstream* NFR1, NFR2 e Ndufb5 e, também da expressão de genes relacionados com a atividade antioxidante celular: CAT, PRX5, GSS, GPX3, GCLC, TRX2, SOD2, SOD3). SYD-1 (50 μ M) aumentou a expressão de caspase 3 em células HepG2 mantidas em meio AG, mas houve uma diminuição quando as células foram mantidas em meio GAL. Os níveis dos metabólitos piruvato, citrato α -cetoglutarato e succinato também se apresentaram aumentados após tratamento com o composto (50 μ M meio AG). SYD-1 (25 μ M) inibiu ABCG2 e não foi substrato para transportadores relacionados à resistência aos tratamentos quimioterápicos (Pgp, ABCG2 e MRP1). SYD-1 diminuiu a viabilidade dos hepatócitos não tumorais somente na maior concentração (50 μ M) após 18h de tratamento. Ensaios com anexina V e iodeto de propídio sugeriram que esta redução deve-se à indução de apoptose nestas células. Considerados em conjunto, os resultados sugerem que o comprometimento de funções mitocondriais pelo SYD-1 está relacionado com sua toxicidade em células HepG2 e que o mesoiônico é um candidato promissor para futuras investigações *in vivo*, visando sua aplicação para o tratamento do carcinoma hepatocelular (CHC).

Palavras-chave: Células HepG2; hepatócitos; SYD-1; bioenergética mitocondrial; família de coativadores PGC1; transportadores ABC.

ABSTRACT

Several biological activities have been described for mesoionic compounds. The sydnone SYD-1 (3-[4-chloro-3-nitrophenyl]-1,2,3-oxadiazolium-5-olate) has shown a significant antitumour activity against Ehrlich carcinoma, Sarcoma 180 and Walker-256. In this study the effects of the mesoionic compound SYD-1 were evaluated in human hepatocellular carcinoma cells (HepG2), considering its high mortality rate and that only one drug is available for its treatment. The effects of SYD-1 were evaluated on cells grown in high glucose DMEM (AG) or DMEM without glucose and with galactose/glutamine (GAL), with the aim to force the metabolism to glycolytic or oxidative phosphorylation, respectively. Further, in order to establish its selectivity, some assays were also performed in rat hepatocytes grown in AG DMEM. SYD-1 reduced the viability of HepG2 cells in a dose-dependent manner, assessed from four different methods. MTT method showed reductions of ~22% and ~49% in viability after treatment with SYD-1 (50 μ M) for cells grown in AG and GAL, respectively. Similar results were obtained from staining with crystal violet and release of LDH in the culture medium. However, no effect was observed when the methodology was the exclusion of trypan blue. The respiration states (basal, leak and uncoupled) were inhibited after treatment with SYD-1 (25 and 50 μ M), being the effects more pronounced in cells grown in GAL medium in comparison to AG medium. At the same conditions, it was observed the decrease of ATP levels (~29%). In turn, the levels of pyruvate decreased by the treatment with 50 μ M of SYD-1 while lactate levels increased. In cells grown in AG, SYD-1 (50 μ M) was also able to increase the expression of PGC1 β and reduce the expression of PGC1 α , after 24h of treatment. After 72h of treatment, SYD-1 (50 μ M) increased the expression of PGC1 α as well as its *downstream* targets NFR1, NFR2 and Ndubf5. The expression of genes related to the antioxidant activity (CAT PRX5, GSS, GPX3, GCLC, TRX2, SOD2, SOD3) were also increased by SYD-1 (50 μ M). The expression of caspase 3 increased in HepG2 cells maintained in AG medium and decreased in cells at GAL medium. The levels of the metabolites pyruvate, citrate, α -ketoglutarate and succinate were also increased after treatment with the compound (50 μ M - AG medium). SYD-1 (25 μ M) inhibited ABCG2 and was not a substrate of transporters associated to chemotherapy resistance (Pgp, MRP1 and ABCG2). SYD-1 decreased the viability of non-tumour hepatocytes only at the highest concentration (50 μ M) after 18h of treatment. Results of assays with annexin-V and PI suggested that the mesoionic was able to induce apoptosis in these cells. Taken together, these results show that the effects of SYD-1 on mitochondrial functions are related to its cytotoxicity on HepG2 cells and suggest that the mesoionic is a promising candidate for future in-vivo investigations aiming to its use for the treatment of hepatocellular carcinoma.

Keywords: HepG2 cells; hepatocytes; SYD-1; mitochondrial bioenergetics, PGC1 family coactivators, ABC transporters.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: CLASSIFICAÇÃO DE BARCELONA E ESTRATÉGIA DE TRATAMENTO TERAPÊUTICO	20
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO GENÉRICA DE UM COMPOSTO MESOIÔNICO ...	23
FIGURA 3: ESTRUTURA REPRESENTATIVA DAS SIDNONAS	24
FIGURA 4: ESTRUTURA QUÍMICA DO 3-[4-CLORO-3-NITROFENIL]-1,2,3-OXADIAZÓLIO-5-OLATO – SIDNONA SYD-1	25
FIGURA 5: ESTRUTURA QUÍMICA DAS SIDNONAS SUBSTITUÍDAS CIS-5 E CIS-10	26
FIGURA 6: BIOGÊNESE MITOCONDRIAL MEDIADA POR PGC1	30
FIGURA 7: FATORES RELACIONADOS COM A INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A QUIMIOTERAPIA	34
FIGURA 8: EFEITO DO SYD-1 SOBRE A LIBERAÇÃO DE LDH EM HEPATÓCITOS	58
FIGURA 9: EFEITO DO SYD-1 NA INDUÇÃO DE MORTE CELULAR EM HEPATÓCITOS	60
FIGURA 10: TOXICIDADE DO SYD-1 EM CÉLULAS HEPG2	63
FIGURA 11: EFEITO DO SYD-1 SOBRE A VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS HEPG2	64
FIGURA 12: MARCAÇÃO DE CÉLULAS HEPG2 COM ANEXINA V-FITC E IODETO DE PROPÍDIO	66
FIGURA 13: EFEITO DO SYD-1 SOBRE OS NÍVEIS DE CASPASE 3 TOTAL E GAPDH	67
FIGURA 14: EFEITO DO SYD-1 SOBRE A RESPIRAÇÃO DE CÉLULAS HEPG2 ADERIDAS	70
FIGURA 15: EFEITO DO SYD-1 SOBRE A RESPIRAÇÃO DE CÉLULAS HEPG2 EM SUSPENSÃO	72
FIGURA 16: EFEITO DO SYD-1 SOBRE OS NÍVEIS DE ATP DE CÉLULAS HEPG2	73
FIGURA 17: EFEITO DO SYD-1 SOBRE OS NÍVEIS DE PIRUVATO E LACTATO DE CÉLULAS HEPG2 EM SUSPENSÃO	75
FIGURA 18: EFEITO DO SYD-1 SOBRE OS NÍVEIS DE PIRUVATO E LACTATO DE CÉLULAS HEPG2 ADERIDAS	76

FIGURA 19: REPRESENTAÇÃO DO FLUXO DE CARBONOS	78
FIGURA 20: EFEITO DO SYD-1 SOBRE OS METABÓLITOS DO CICLO DE KREBS - U-C ¹³ GLUCOSE	80
FIGURA 21: EFEITO DO SYD-1 SOBRE OS METABÓLITOS DO CICLO DE KREBS - U-C ¹³ GLUTAMINA	81
FIGURA 22: EFEITO DO SYD-1 SOBRE A EXPRESSÃO DE PGC1A E SEUS ALVOS APÓS 24 H DE TRATAMENTO	83
FIGURA 23: EFEITO DO SYD-1 SOBRE A EXPRESSÃO DE PGC1A E SEUS ALVOS APÓS 72 H DE TRATAMENTO	85
FIGURA 24: EFEITO DO SYD-1 SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM O ESTRESSE OXIDATIVO	87
FIGURA 25: POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO DO SYD-1 EM CÉLULAS HEPG2	95

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: PRIMERS UTILIZADOS PARA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL .	52
TABELA 2: EFEITO DO SYD-1 SOBRE ATIVIDADE MDR DE TRANSPORTE CELULAR.....	89

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASA	- Ácido acetilsalicílico
ATP5j	- ATP sintase, transportador H ⁺ , subunidade mitocondrial F6 do complexo Fo
BSA	- Albumina de soro bovino
CAT	- Catalase
CHC	- Carcinoma Hepatocelular
DMEM	- Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DPH	- 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DPH-PA	- 3-[p-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienil]-fenil-ácido propiônico
EB	- Fator de transcrição EB
EC ₅₀	- 50% da concentração máxima efetiva
EGTA	- Ácido etileno glicol bis (éter 2-amino-etil) N,N,N',N' tetracético
ERR α	- Receptor alfa de estrogênio
FCCP	- Carbonil cianeto p-trifluormetoxifenilhidrazona
FXR	- Receptor farnesoide X ou Receptor de ácido biliar
GCLC	- Glutamato cisteína ligase
GPX3	- Glutational peroxidase
GR	- Receptor de glucocorticóide
GSS	- Glutational sintetase
HBSS	- Solução salina balanceada de Hanks
HEPES	- N-(2-hidroxietil) piperina N' (ácido 2-etano sulfônico)
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
MTBSTFA	- N-tert-Butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida com 1% tert-Butildimetilclorosilana
MTT	- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

Ndufb5	- NADH:Ubiquinona Oxidoreductase Subunidade B5
NFR1	- Fator respiratório nuclear 1
NFR2	- Fator respiratório nuclear 2
PBS	- Solução salina tamponada
PGC1 α	- Coativador-1 α do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
PGC1 β	- Coativador-1 β do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
PI	- Iodeto de propídio
PPAR α	- Receptor ativado por proliferador de peroxissoma α
PRC	- Coativador relacionado a PGC1
PRX3	- Peroxirredoxina 3
PRX5	- Peroxirredoxina 5
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
SFB	- Soro fetal bovino
SIRT1	- Sirtuina 1
SOD1	-Superóxido dismutase 1, citosólica
SOD2	-Superóxido dismutase 2, mitocondrial
SOD3	-Superóxido dismutase 3, extracelular
SYD-1	-3-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olato
Tris	-Tris (hidroximetil) amino metano
TRX2	-Tioredoxina 2
UCP1	-Proteína desacopladora 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Carcinoma Hepatocelular.....	19
3.2 Compostos mesoiônicos: Sidnona SYD-1	22
3.3 Mitocôndrias e Reprogramação Metabólica	27
3.4 Família de Coativadores Transcricionais PGC1	29
3.5 Resistência a Múltiplas Drogas e Transportadores ABC.....	33
4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	36
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
5.1 Reagentes	37
5.2 Preparo da solução de SYD-1	37
5.3 Hepatócitos isolados de fígado de rato	38
5.3.1 Animais	38
5.3.2 Solução de Perfusão	38
5.3.3 Solução de Isolamento 1 – Hepatócitos	38
5.3.4 Solução de Isolamento 2 - Hepatócitos	39
5.3.5 Meios de cultura para hepatócitos	39
5.3.6 Cultura Primária de Hepatócitos	39
5.4 Células HepG2.....	41
5.4.1 Soluções	41
5.4.1.1 Solução Salina Tamponada (PBS).....	41
5.4.1.2 Solução Dispersante de Células – Tripsina/EDTA.....	41
5.4.2 Meios de cultura para células HepG2	42
5.4.2.1 DMEM AG	42
5.4.2.1 DMEM GAL	42
5.4.3 Cultura de células HepG2	42
5.5 Cultura de células HEK293 e NH3T3 parentais e superexpressando os principais transportadores ABC.....	43
5.6 Métodos Analíticos	44
5.6.1 Determinação da viabilidade celular	44
5.6.1.1 Redução do MTT.....	44

5.6.1.2 Atividade da LDH no meio de cultura.....	45
5.6.1.3 Coloração com Cristal Violeta	46
5.6.1.4 Coloração com Azul de Tripan.....	46
5.6.2 Respiração Celular	47
5.6.3 Determinação dos níveis de Lactato e Piruvato	48
5.6.4 Determinação dos Níveis de ATP	49
5.6.5 Análise do transporte ou inibição dos transportadores ABC pelo SYD-1	50
5.6.6 Marcação com anexina e PI - Análise de morte celular	51
5.6.7 Análise dos níveis de mRNA (PGC1 e seus alvos; enzimas antioxidantes) ...	52
5.6.8 Análise Metabolômica	53
5.6.9. Análise da expressão protéica	54
5.6.10 Determinação da concentração de proteínas	55
5.7 Análise estatística	55
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
6.1 Efeitos do SYD-1 em Hepatócitos não tumorais	57
6.1.1 Viabilidade	57
6.1.2 Morte Celular	58
6.2 Efeitos do SYD-1 em Linhagem de Hepatocarcinoma Humano (células HepG2).....	61
6.2.1 Viabilidade	61
6.2.2 Morte celular	65
6.2.3 Expressão proteica.....	66
6.2.3 Respiração Celular	67
6.3.3 Níveis de ATP, Lactato e Piruvato.....	73
6.3.4 Metabolômica.....	77
6.3.5 Níveis de mRNA (PGC1 e seus alvos; enzimas antioxidantes).....	82
6.3.7 Resistência a múltiplas drogas (MDR).....	88
7. DISCUSSÃO FINAL	89
8. CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS.....	97
ANEXO 1	109
ANEXO 2	110
ANEXO 3	113

1. INTRODUÇÃO

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde, 21,4 milhões de pessoas desenvolverão algum tipo de câncer até 2030, sendo estimados 13,2 milhões de mortes. Somente no Brasil, a estimativa divulgada pelo INCA é de aproximadamente 600 mil novos casos da enfermidade nos anos de 2016-2017 (SCHILITZH *et al.*, 2015). Dentre os diferentes tipos de câncer, o carcinoma hepatocelular (CHC) representa a segunda causa de morte relacionada ao câncer no mundo (TORRE *et al.*, 2015). Isto decorre da característica multifatorial de sua patogênese e da reduzida eficácia dos tratamentos, resultando em graves efeitos colaterais nestes pacientes (SINGAL; EL-SERAG, 2015) e abandono do tratamento antes da completa erradicação do tumor (MAHATO *et al.*, 2011). Além disso, outra grande dificuldade relacionada ao tratamento do câncer é o desenvolvimento de resistência das células tumorais aos quimioterápicos. Dentre os mecanismos de resistência destaca-se a superexpressão de bombas de efluxo dependente de ATP como: a glicoproteína P (Pg-p), a proteína 1 associada a resistência a multidroga (MRP1) e a proteína de resistência ao câncer de mama (ABCG2). Estes transportadores são capazes de promover o efluxo de drogas com estruturas e funções relacionadas, diminuindo suas concentrações intracelulares e consequentemente seus efeitos (KARTAL-YANDIM *et al.*, 2016). Nesse contexto, no presente trabalho, foram avaliados os efeitos do SYD-1 sobre transportadores com cassete de ligação ao ATP, associados à resistência a quimioterápicos.

Com relação ao tratamento farmacológico do CHC, existe apenas um medicamento (Sorafenibe) aprovado para seu tratamento clínico e, a baixa sobrevida observada mesmo com sua utilização, têm estimulado a busca por novos compostos que possam representar uma melhor alternativa (BUPATHI *et al.*, 2015; FITZMORRIS *et al.*, 2015). Entre os compostos estudados, os denominados mesoiônicos merecem especial atenção por apresentarem diversas atividades biológicas, dentre as quais se destaca a antitumoral.

Considerando a importante atividade antitumoral descrita para o composto mesoiônico 3-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olato (SYD-1), pertencente à classe das sidnonas, contra diferentes tipos de câncer, e, ainda, a inexistência de literatura que relate o efeito deste composto sobre linhagens de CHC, no presente estudo foi avaliada sua toxicidade em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) e em hepatócitos murino.

Sabe-se, ainda, que SYD-1 compromete o processo de fosforilação oxidativa, principalmente por promover uma importante inibição do transporte de elétrons na cadeia respiratória (HALILA *et al.*, 2007), efeito possivelmente associado à sua atividade antitumoral. Nesse contexto, sabe-se que inibidores do transporte de elétrons na cadeia respiratória podem causar o aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), uma vez que a mitocôndria é a principal fonte celular de ROS. Por sua vez, o estresse oxidativo resultante pode levar a morte celular (SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

Nas células tumorais os níveis de ROS são maiores quando comparados a células normais, levando a um persistente estado pró-oxidativo (TOYOKUNI *et al.*, 1995). Agentes quimioterápicos capazes de induzir a um aumento na síntese de ROS ou de reduzir sua eliminação podem favorecer um acúmulo ainda maior destas espécies em células tumorais já estressadas, até um momento que ultrapasse o limite de tolerância e a capacidade detoxificante, induzindo então estas células à morte (SCHUMACKER, 2006; FANG *et al.*, 2009; GACH *et al.*, 2015). (MILEO; MICCADEI, 2016). Portanto, compostos que têm como alvo vias de sinalização do estado redox intracelular, da síntese de ROS ou das enzimas antioxidantes em células tumorais, apresentam importante potencial que deve ser explorado na busca por novos compostos antitumorais.

Com base nestas informações, neste estudo foram ainda avaliados os efeitos promovidos pelo composto sobre o metabolismo de células tumorais HepG2, com enfoque

particular no envolvimento das funções mitocondriais, através da reprogramação do metabolismo destas células.

Por fim, foram avaliados também os efeitos do SYD-1 sobre a expressão de PGC1 α e PGC1 β e, ainda, de alguns de seus alvos. Isso porque, a família de coativadores transcricionais PGC1 é responsável por regular o metabolismo celular, particularmente a biogênese mitocondrial, através da interação com fatores nucleares específicos em cada tecido (TAN *et al.*, 2016).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Importantes limitações ao tratamento farmacológico do câncer incluem o surgimento de graves efeitos colaterais, além da resistência aos medicamentos utilizados, resultando na maioria dos casos na descontinuidade do tratamento antes da erradicação completa do tumor. Os efeitos colaterais associados a quimioterapia estão relacionados à falta de seletividade para as células tumorais, enquanto a resistência ao tratamento está relacionada a diferentes fatores, entre estes o aumento da atividade de bombas de efluxo de drogas, como a família de transportadores com cassete para ligação de ATP (ABC) (GOTTESMAN *et al.*, 2002).

Considerando que a quimioterapia é a forma terapêutica de escolha para pacientes com tumores metastáticos ou em estágio avançado de desenvolvimento da doença, a busca por compostos que sejam mais eficazes, específicos e que apresentem menores efeitos colaterais é fundamental. Nesse sentido, o composto mesoiônico SYD-1 merece destaque, uma vez que estudos prévios demonstraram que este possui importante atividade antitumoral tanto *in vivo* quanto *in vitro*, possivelmente relacionada ao comprometimento da fosforilação oxidativa (HALILA *et al.*, 2007; BRANDT, 2012; GOZZI *et al.*, 2013).

A família de coativadores transcricionais PGC1 α tem um papel central na indução da maioria das vias metabólicas celulares, particularmente da biogênese mitocondrial, modulando a composição e funções destas organelas. A expressão anormal de PGC1 está associada com o desenvolvimento de várias doenças crônicas, entre estas o câncer. Desta forma, PGC1 é um promissor alvo terapêutico a ser explorado (TAN *et al.*, 2016).

Assim, considerando que o SYD-1 possui importante atividade antitumoral e citotóxica já previamente demonstradas, e baseados na hipótese que o efeito apresentado pelo composto mesoiônico está relacionado ao comprometimento de funções mitocondriais ligadas à provisão de energia, o objetivo geral deste estudo foi investigar os mecanismos

pelos quais este composto exerce estas atividades, avaliando os efeitos promovidos pelo mesoiônico sobre o metabolismo de células tumorais e não tumorais, com enfoque particular nas funções mitocondriais. Para cumprir este objetivo foram utilizadas células de hepatocarcinoma humano (HepG2) e hepatócitos murino não tumorais, como modelos experimentais.

Objetivos específicos:

- 1- Em cultura primária de hepatócitos murino avaliar os efeitos dos SYD-1 sobre a viabilidade celular e vias de indução de morte, buscando estabelecer uma possível seletividade do composto.
- 2- Em células HepG2 aderidas crescidas em meio AG ou GAL, avaliar os efeitos do SYD-1 sobre as funções mitocondriais, buscando estabelecer uma possível relação entre disfunção mitocondrial e efeito citotóxico;
- 3- Em células HepG2 aderidas, crescidas em meio AG, avaliar os efeitos do SYD-1 sobre os metabólitos do ciclo de krebs e a expressão da família de coativadores PGC1 e seus alvos, bem como de genes relacionados com atividade antioxidante, com o objetivo de avaliar qual o impacto do tratamento com o composto sobre o metabolismo oxidativo destas células. Ainda, usando este mesmo modelo, avaliar ativação da via apoptótica na tentativa de esclarecer uma possível via de morte induzida pelo composto.
- 4- Em células embrionárias de rim humano (HEK293) ou fibroblastos murino (NIH3T3) superexpressando ou não os principais transportadores ABC (ABCG2, MRP1 e Pgp), avaliar a capacidade do SYD-1 de inibir o transporte de drogas ou ser transportado por estes transportadores, com o objetivo de avaliar se o mesoiônico tem potencial para ser utilizado como um agente antitumoral *in vivo*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Carcinoma Hepatocelular

O CHC é um grave problema de saúde pública mundial, constituindo aproximadamente 90% dos casos de tumores primários hepáticos. Representa a segunda causa de morte relacionada ao câncer no mundo (FERLAY *et al.*, 2015), sendo responsável por aproximadamente 800 mil óbitos anuais e incidência de 850 mil novos casos (TORRE *et al.*, 2015). No Brasil, o INCA estima 600 mil novos casos de câncer para os anos de 2016-2017 (BRASIL, 2014-2015). Os fatores de risco relacionados ao desenvolvimento desta doença são bem definidos, como cirrose (presente em 80% dos casos), infecção pelos vírus da hepatite B e C, tabagismo, alcoolismo e consumo de alimentos contaminados com aflotoxinas, entre outros (LAFARO *et al.*, 2015).

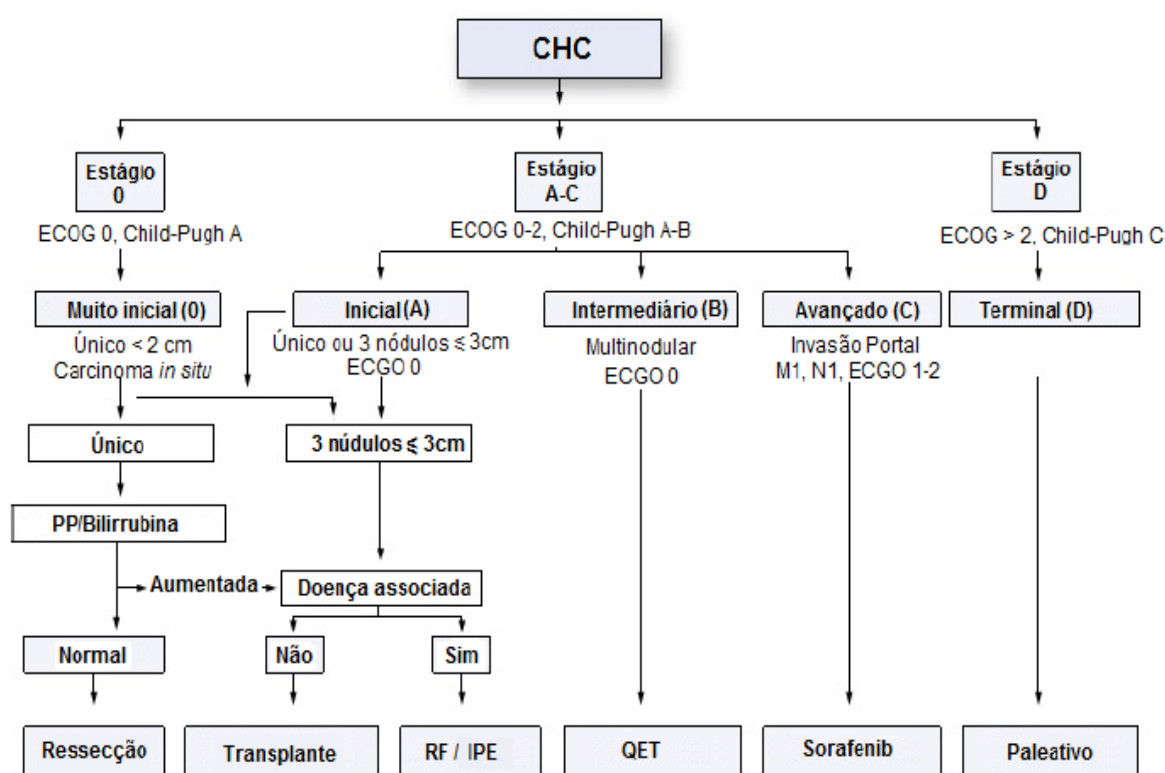
A classificação do CHC proposta pela Clínica de Câncer Hepático de Barcelona (FIGURA 1) é uma das mais usadas mundialmente para eleger o tratamento mais adequado para esse tipo de câncer. Nesta classificação são considerados critérios como o tamanho do tumor, a gravidade da função hepática e o estado de desempenho do paciente (LLOVET *et al.*, 2016).

Os tratamentos considerados curativos, que incluem ressecção cirúrgica, transplante e ablação percutânea, são recomendados para pacientes em estágios iniciais do CHC. Entretanto, apenas 20-30% dos diagnósticos são realizados nesta fase. Estes tratamentos proporcionam uma taxa de sobrevida de até 5 anos em 60-80% dos pacientes, porém, altas taxas de recorrência são observadas após este período em pacientes submetidos à ressecção cirúrgica (DUSEJA, 2014; BRUIX *et al.*, 2016; LLOVET *et al.*, 2016).

O transplante de fígado, em relação a ressecção, possui a vantagem de eliminar tanto o tumor quanto possíveis problemas não aparentes de um fígado cirrótico

(HATZARAS *et al.*, 2014). No entanto, a grande desvantagem do transplante é a escassez de órgãos disponíveis para doação, obrigando os pacientes a permanecerem por muito tempo a espera de um doador. Estudos demonstram que o transplante de fígado apresenta grande sucesso se realizado dentro de seis meses após o diagnóstico, porém, 12 meses depois, mais de 29% destes pacientes tornam-se inelegíveis para o mesmo devido à progressão do carcinoma (FITZMORRIS *et al.*, 2015)

FIGURA 1: CLASSIFICAÇÃO DE BARCELONA E ESTRATÉGIA DE TRATAMENTO TERAPÊUTICO



FONTE: Adaptado de EASL-EORTC 2012, com autorização de ELSEVIER (número de licença 3942670703982).

NOTA: A classificação do CHC proposta pela Clínica de Câncer Hepático de Barcelona divide os pacientes em 5 estágios (A-D), considerando variáveis do tumor (sistema TNM), função hepática (escala Child-Pugh) e estado de saúde do paciente (ECGO). **M1 e N1:** Estágios pertencentes ao sistema TNM de classificação de tumores (tamanho, presença em linfonodos, metástases), onde M1 indica presença de metástase distante e N1 metástase em linfonodos; **ECGO:** escala de desempenho desenvolvida pelo Grupo Oriental de Oncologia Cooperativa, pontuando de 0 (totalmente ativo, desempenhando funções sem restrições) a 5 (morte); **Child-Pugh:** classificação utilizada para avaliar o prognóstico da doença hepática crônica, pontuando de 1 a 3 ao considerar os níveis de albumina, bilirrubina, tempo de protrombina, ascite e grau de encefalopatia. RF: radiofrequência; IPE: injeção percutânea de etanol; QET: quimioembolização transarterial; PP: pressão portal.

Para evitar este cenário, várias estratégias de tratamento estão sendo adotadas, como ablação percutânea, quimioembolização e quimioterapia. As técnicas ablativas induzem a necrose tumoral através de injeções locais de substâncias químicas como etanol, ou termicamente através de modificações na temperatura do microambiente (radiofrequência e microondas) com mínimo efeito sobre o tecido adjacente saudável (FITZMORRIS *et al.*, 2015). Estima-se que 90-100% dos tumores menores que 2cm são totalmente necrosados após injeção percutânea de etanol (IPE), taxa esta que diminui para 70% e 50% ao considerar os tumores maiores, entre 2-3cm e maiores que 5cm, respectivamente (SHIINA *et al.*, 1990; GRANDHI *et al.*, 2016). Utilizando este tratamento, as taxas de sobrevivência são comparáveis aquelas da técnica de ressecção cirúrgica (WANG *et al.*, 2014). No entanto, tem como fator limitante uma alta taxa de reincidência, que pode alcançar 51% após 3 anos (LIN *et al.*, 2004). Com a utilização de radiofrequência (RF), por outro lado, a taxa de reincidência, nas mesmas condições, cai para 14% (MULIER *et al.*, 2005). Somando-se a isso, a taxa de sobrevivência obtida pela RF (63-81%) após três anos de tratamento, é superior quando comparada a IPE (48-67%) (CHO *et al.*, 2009).

Para os pacientes em estágio avançado da doença, o único tratamento que demonstrou aumento de sobrevida foi a quimioterapia sistêmica utilizando sorafenibe, enquanto que para estágios finais do CHC, quando a função hepática está severamente comprometida, a única medida a ser adotada é paliativa (EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE *et al.*, 2012; BRUIX *et al.*, 2016). Além disso, este composto pode ser usado como adjuvante na terapia para reduzir as taxas de recorrência tumoral após aplicação de técnicas potencialmente curativas (XIA *et al.*, 2016).

O sorafenibe surgiu em 2007 e permanece até hoje como o único fármaco aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do CHC, um carcinoma conhecido por ser refratário ao tratamento quimioterápico sistêmico (EUROPEAN

ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE *et al.*, 2012; GRANDHI *et al.*, 2016). Seu mecanismo de ação envolve a inibição de algumas quinases responsáveis pela sinalização da proliferação celular e angiogênese, além de aumentar a taxa de apoptose celular. Estima-se que o tratamento com sorafenibe diminua em 31% a chance de morte associada ao CHC e aumente em 2-3 meses a média geral de sobrevivência destes pacientes (LLOVET *et al.*, 2008). Um estudo realizado por Doyle e colaboradores (2016), avaliando os registros médico em oito diferentes hospitais Australianos, incluindo 320 pacientes portadores de CHC e tratados com sorafenibe (início entre janeiro 2007 e junho de 2014 e acompanhados até maio de 2015), demonstraram que 79% dos pacientes apresentaram efeitos colaterais como náuseas, diarreia, fadiga, erupções cutâneas e anorexia. Dentre estes pacientes, 31% necessitaram redução da dose e 32% tiveram o tratamento interrompido devido a gravidade dos efeitos colaterais (DOYLE *et al.*, 2016).

Assim, a gravidade do CHC é aumentada pela baixa eficácia dos tratamentos disponíveis (BUPATHI *et al.*, 2015), o que justifica a pesquisa de novos compostos que sejam mais efetivos e seletivos para as células tumorais, bem como apresentem menores efeitos colaterais, fatores limitantes do tratamento utilizado atualmente.

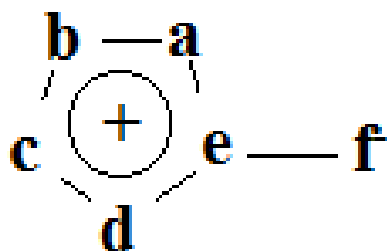
3.2 Compostos mesoiônicos: Sidnona SYD-1

A ciência busca constantemente novos compostos que possam ser aplicados no tratamento de diferentes doenças. Nesse sentido, os compostos mesoiônicos têm se destacado devido às atividades biológicas que têm sido descritas para esta classe como: antiinflamatória, analgésica (DESHPANDE; PAI, 2012), antifúngica (PAIVA RDE *et al.*, 2015) e antitumoral (WAGHC, 2015).

Os compostos mesoiônicos possuem como estrutura básica um anel heterocíclico de cinco membros, cuja carga delocalizada é contrabalançada por carga oposta presente no átomo ou grupo exocíclico. Devido a estas características estruturais, esses compostos

apresentam propriedades químicas muito interessantes. A ausência de carga global permite atravessar membranas biológicas, e, ainda, a presença de dipolo elétrico em sua estrutura favorece sua interação com biomoléculas, incluindo proteínas e DNA (KIER; ROCHE, 1967; OLLIS, 1976; MALLUR; LALWANI, 2007; MASAMI KAWASE, 2009). A estrutura genérica que os representa está demonstrada na FIGURA 2, onde as letras de **a** até **f** representam átomos como carbono, nitrogênio, oxigênio ou enxofre, seguidos de seus substituintes, específicos para cada classe e/ou tipo de composto. Assim, os compostos mesoiônicos são agrupados em classes de acordo com a constituição do anel mesoiônico, sendo as principais: as sidnonas, sidnoniminas, oxatriazóis, 1,3,4-tiadiazóis e isosidnonas (MASAMI KAWASE, 2009).

FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO GENÉRICA DE UM COMPOSTO MESOIÔNICO



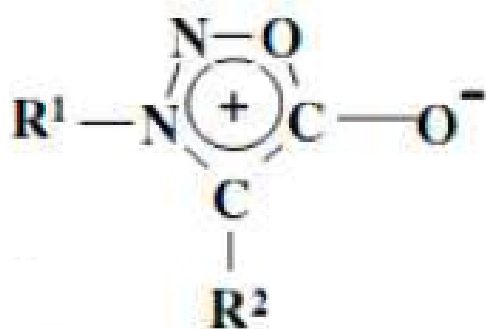
FONTE: O autor.

NOTA: As letras a-f representam geralmente átomos de carbono, nitrogênio, oxigênio ou enxofre.

Os primeiros compostos mesoiônicos sintetizados pertenciam à classe das sidnonas, sendo que, a primeira sidnona (FIGURA 3), foi sintetizada no ano de 1935 por Earl e Mackney na Universidade de Sydney, e foram assim nomeadas em homenagem a instituição (KIER; ROCHE, 1967; BADAMI, 2006; MASAMI KAWASE, 2009; CHANDRASEKHAR; NANJAN, 2012). O primeiro relato de avaliação da atividade biológica das sidnonas data do ano de 1957. A partir de então, uma grande variedade de derivados de sidnonas vêm sendo largamente sintetizados (KIER; ROCHE, 1967; OLLIS,

1976; CHANDRASEKHAR; NANJAN, 2012) e avaliados quanto sua atividade biológica, já sendo comprovadas atividades como: antibacteriana (ASUNDARIA; PATEL, 2010), antitumoral (DUNKLEY; THOMAN, 2003), analgésica, antiinflamatória, antihelmíntica (KALLURAYA *et al.*, 2001) e doadora de oxido nítrico (SCHONAFINGER, 1999).

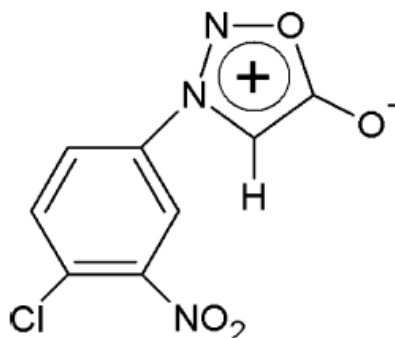
FIGURA 3: ESTRUTURA REPRESENTATIVA DAS SIDNONAS



FONTE: (NEWTON, 1982).

Dentre os compostos que compõem esta classe, a sidnona SYD-1 (3-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olato - SYD-1 - FIGURA 4), merece destaque pela importante atividade antitumoral demonstrada tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A efetividade deste composto foi confirmada posteriormente por Grynberg e colaboradores em 1992. Os autores administraram o composto por via intraperitonal 24 h após a inoculação dos tumores e avaliaram o tempo de sobrevivência dos animais. Como resultado, os autores demonstraram que o SYD-1 aumentou a sobrevida dos animais com Sarcoma 180, Carcinoma de Ehrlich e Histiocitoma fibroso (B10MCII). Além disso, é importante destacar que não houve mudanças no perfil hematológico dos animais (GRYNBERG *et al.*, 1992).

FIGURA 4: ESTRUTURA QUÍMICA DO 3-[4-CLORO-3-NITROFENIL]-1,2,3-OXADIAZÓLIO-5-OLATO – SIDNONA SYD-1

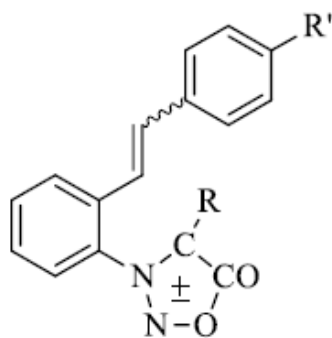


Fonte: O autor.

Dunkley e Thoman (2003), em um estudo posterior, testaram diferentes compostos mesoiônicos substituídos, pertencentes a classe das sidnonas, contra três linhagens de células tumorais: MCF7 (câncer de mama), NCI-H460 (câncer de pulmão) e SF-268 (câncer de SNC). O composto que possuía o Cl como substituinte (SYD-1) apresentou a maior atividade citotóxica, confirmando assim a atividade previamente descrita para este composto (DUNKLEY; THOMAN, 2003).

Na busca por novos compostos com potencial atividade farmacológica, Butković e colaboradores (2011) sintetizaram 32 diferentes sidnonas substituídas (*cis*- e *trans*-) com estilbenos, e avaliaram sua atividade antiproliferativa sobre diferentes linhagens tumorais: HeLa (carcinoma cervical), MCF-7 (carcinoma da mama), SW620 (carcinoma do cólon), MiaPaCa-2 (carcinoma pancreático), e H460 (carcinoma do pulmão). Os compostos apresentaram em geral, de baixo a moderado efeito antiproliferativo, sendo que os derivados *cis*-substituídos foram mais efetivos, com destaque para os compostos *cis*-5 e *cis*-10 (FIGURA 5) (BUTKOVIĆ, 2011).

FIGURA 5: ESTRUTURA QUÍMICA DAS SIDNONAS SUBSTITUÍDAS cis-5 e cis-10



5 R=CH₃, R'=CH₃

10 R=Ph, R'=Cl

Fonte: (BUTKOVIĆ, 2011).

Mais recentemente, Galuppo e colaboradores (2016) avaliaram os efeitos da sidnona SYD-1 em ratos portadores de carcinosarcoma (tumor Walker-256) após 12 dias de tratamento (via oral) com o SYD-1 (75mg/Kg). Os autores observaram uma diminuição de 54% no volume e de 41% no peso do tumor. Além disso, o tratamento com o composto diminuiu os níveis de glutathione no tecido tumoral e aumentou a expressão de proteínas pró-apoptóticas como Bax, p53 e caspase-3, e diminuiu a expressão de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2. No entanto, foi observado um significativo aumento no volume do baço e alterações hematológicas que, segundo os autores, merecem ser investigados (GALUPPO *et al.*, 2016).

Na tentativa de esclarecer o mecanismo de ação do SYD-1 e considerando o envolvimento das mitocôndrias nos processos de morte celular, Halila e colaboradores (2007) avaliaram os efeitos do composto em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Os autores demonstraram que o SYD-1 reduziu o potencial de membrana, a velocidade respiratória no estado 3 e o inchamento mitocondrial, além de aumentar a respiração no estado 4 e atividade ATPásica. No entanto, seu efeito mais significativo foi a inibição do transporte de elétrons, o que poderia levar ao aumento na produção de ROS, e,

consequentemente à morte celular (HALILA *et al.*, 2007). Neste contexto, Gozzi e colaboradores (2013) demonstraram, também em mitocôndrias isoladas, que o SYD-1 é capaz de sequestrar O_2^- , inibir a lipoperoxidação ferro-induzida e a formação/abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. A partir destes resultados os autores sugeriram que a atividade antitumoral do mesoiônico parece não ser mediada pelo aumento da produção de ROS nestas organelas (GOZZI *et al.*, 2013).

3.3 Mitocôndrias e Reprogramação Metabólica

Devido ao seu envolvimento em importantes processos celulares como a produção de energia e mecanismos de morte celular, a mitocôndria tem se tornado um importante objeto de pesquisas que buscam por novos agentes antitumorais (BARBOSA *et al.*, 2012). Quando o mecanismo de ação de um agente quimioterápico inclui efeitos sobre esta organela, geralmente são relatadas importantes modificações estruturais e/ou funcionais como, por exemplo, alterações na permeabilidade das membranas mitocondriais externa e interna com a consequente liberação do citocromo *c* e de outros fatores indutores de morte para o citosol. Estes fenômenos frequentemente vêm acompanhados do aumento dos níveis de ROS e de danos ao DNA mitocondrial. É preciso considerar também que às células tumorais são mais sensíveis ao aumento nos níveis de ROS em relação as não-tumorais, uma vez que seu ambiente já é oxidativo (GLOVER *et al.*, 2007; BLACKMAN *et al.*, 2012).

Sabe-se que células tumorais em geral utilizam preferencialmente o metabolismo glicolítico para obtenção de energia, mesmo em presença de concentrações adequadas de oxigênio, alteração conhecida como efeito Warburg (WARBURG, 1956). No entanto, células tumorais também utilizam a glutamina, que através da glutaminólise alimenta o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa (GOGVADZE *et al.*, 2008; CHENG *et al.*, 2016). Uma estratégia experimental interessante para avaliar a dependência das células tumorais

da via glicolítica e/ou da fosforilação oxidativa para sua sobrevivência é variar os componentes do meio de cultura de forma a direcionar o metabolismo para uma dessas vias metabólicas. Isto pode ser feito substituindo-se o meio rico em glucose, normalmente utilizado para culturas de células tumorais, por meio enriquecido com galactose e glutamina. A Glutamina é convertida a glutamato - reação catalisada pela enzima glutaminase-, que após desaminação oxidativa gera o alfa-cetoglutarato, intermediário do ciclo de Krebs, direcionando as células tumorais a utilizarem a fosforilação oxidativa como principal fonte de ATP (GOHIL *et al.*, 2010). Em relação à galactose, Rossignol e colaboradores sugerem que o papel do monossacarídeo relaciona-se com o aumento na expressão de genes da cadeia transportadora de elétrons, como demonstrado em células HeLa (ROSSIGNOL *et al.*, 2004).

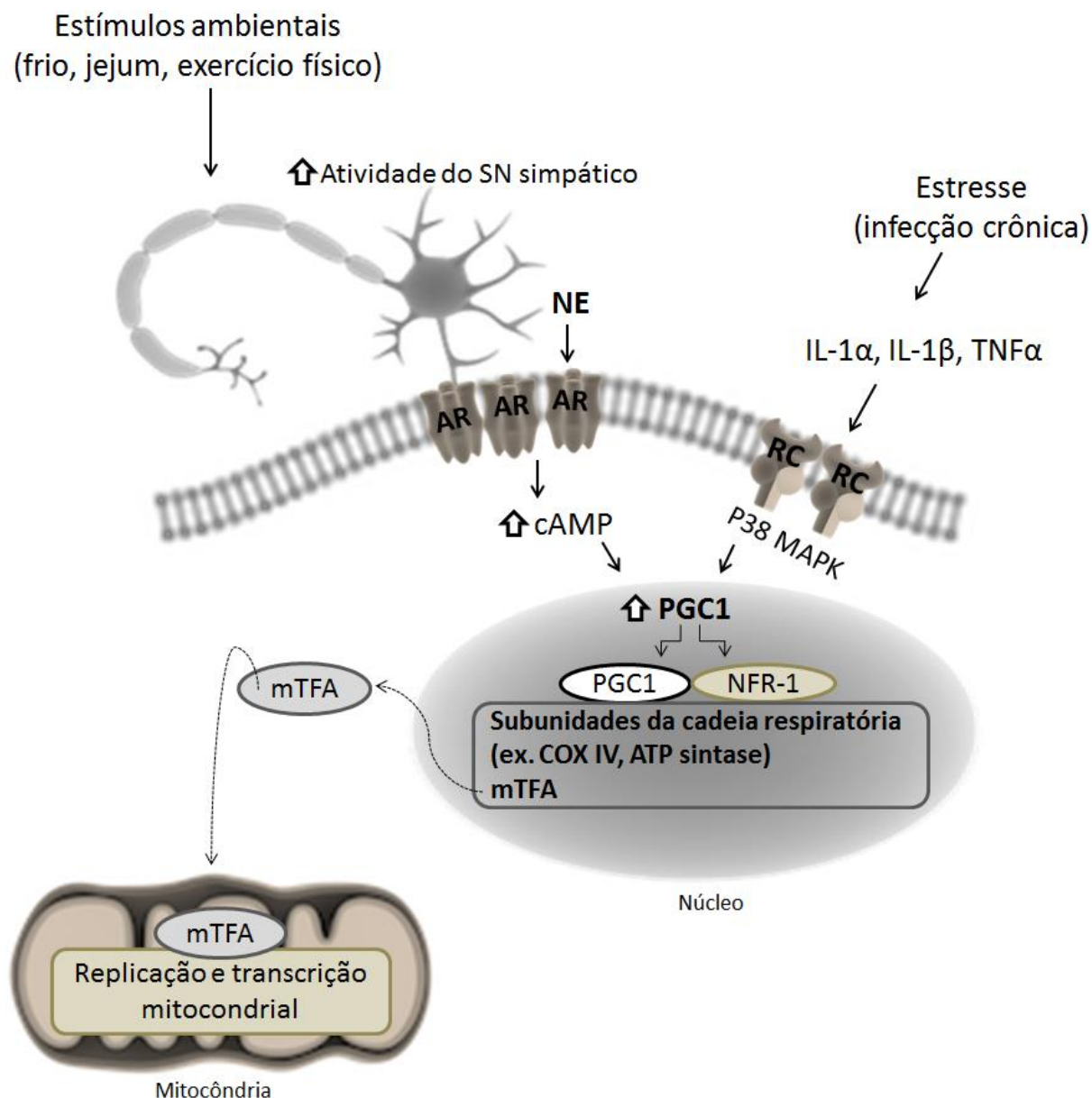
Ainda neste contexto, Marroquin e colaboradores cultivaram células HepG2 em meio com galactose/glutamina (10mM/6mM) e, comparativamente, com alta (25mM) e baixa (5,5mM) glucose. As células que cresceram em meio rico em galactose/glutamina apresentaram uma susceptibilidade muito maior a inibidores e desacopladores mitocondriais (oligomicina, rotenona e antimicina e FCCP), com consequente redução nos níveis de ATP quando comparadas às células crescidas em meio com glucose. Assim, por exemplo, enquanto as células crescidas em meio com glucose se mantinham viáveis com 1µM de rotenona, quando crescidas em meio rico em galactose, perdiam a viabilidade com a adição de 0,1µM de rotenona. Isto porque, nestas condições, as células dependiam quase que exclusivamente da fosforilação oxidativa para a geração de energia, o que permitiu aos autores concluir que compostos que atuem sobre esta organela seriam mais tóxicos para estas células (MARROQUIN *et al.*, 2007). Desta forma, direcionar o metabolismo oxidativo através da variação dos componentes do meio de cultura é uma estratégia experimental importante para esclarecer o mecanismo de ação de drogas antitumorais.

3.4 Família de Coativadores Transcricionais PGC1

A regulação de diferentes vias metabólicas em células de mamíferos pode ser realizada por uma família de coativadores da transcrição gênica composta por três membros: PGC1 α (coativador-1 α do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma), PGC1 β (coativador-1 β do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma) e PRC (coativador relacionado a PGC1). O PGC1 α foi o primeiro a ser identificado e inicialmente era conhecido apenas por ativar a termogênese em tecido adiposo marrom, através da regulação da proteína desacopladora 1 (UCP1). Esta proteína é capaz de desacoplar a fosforilação oxidativa e, com isso, a energia que seria utilizada para síntese de ATP é direcionada para produção de calor. Atualmente, sabe-se que PGC1 α é ativado por sinais que controlam a homeostase de energia e nutrientes em diferentes tecidos, como frio, exercício intenso e jejum prolongado, sendo altamente expressos em tecidos que demandam grande quantidade de energia como tecido adiposo marrom e músculo esquelético (LIU; LIN, 2011; TAN *et al.*, 2016). Nestes tecidos coordena a expressão de genes que estimulam a biogênese mitocondrial (FIGURA 6), programas termogênicos no tecido adiposo marrom, mudança de tipo de fibra em tecidos esqueléticos e vias ligadas a resposta ao jejum no fígado (KNUTTI; KRALLI, 2001; PUIGSERVER, 2003; PUIGSERVER, 2005). Difere-se dos fatores de transcrição por não possuir o domínio de ligação ao DNA, e para que seja funcional, PGC1 α recruta de forma dinâmica e sequencial diferentes proteínas, formando um complexo proteico que é então capaz de promover a transcrição de genes específicos (PUIGSERVER, 2005). Os fatores de transcrição, por sua vez, se ligam em sequências específicas do DNA, mas geralmente não possuem a atividade enzimática necessária para modificar a cromatina, desenrolar o DNA e recrutar a RNA polimerase II, eventos necessários para que se inicie a transcrição de um

gene. Esta atividade é função dos coativadores transcripcionais (PUIGSERVER *et al.*, 1998).

FIGURA 6: BIOGÊNESE MITOCONDRIAL MEDIADA POR PGC1



FONTE: Adaptado de (WU *et al.*, 1999), com autorização de ELSEVIER (licença número 3944921453891)
 NOTA: Estímulos ambientais como frio, jejum e exercícios físicos intensos, estimulam o sistema nervoso simpático, levando à liberação de noradrenalina, que, por sua vez, desencadeia a ativação dos receptores β-adrenérgicos, resultando na elevação intracelular de cAMP e indução do PGC1. Este coativador, induz a expressão de subunidades da cadeia respiratória e mTFA através da ligação a fatores de transcrição como NRF e aumentando sua atividade transricional. mTFA é translocado para a mitocôndria e ativa diretamente a transcrição e replicação do mtDNA. Além disso, PGC1 pode ser ativado através da fosforilação direta promovida pela proteína p38MAPK, que promove sua estabilização. Esta, é ativada por citocinas como IL-1α, IL-1β e TNFα que são liberadas pela instalação de um estímulo estressor como uma doença crônica (como por exemplo o câncer).
 NE: noradrenalina, AR: receptores beta-adrenérgicos, RC: receptores de citocina, NRF: fator respiratório nuclear; mTFA: Fator de transcrição mitocondrial A.

Assim, PGC1 α regula o metabolismo por ligar-se a fatores de transcrição que são responsáveis por ativar os genes mitocondriais específicos em cada tecido. Como exemplo destes fatores estão: NRF-1 e ERR α (genes mitocondriais); PPAR α e SIRT1 (genes da oxidação de ácidos graxos); GR (genes da gluconeogênese); FXR (genes do metabolismo dos triglicerídeos); EB (genes relacionados à autofagia) e UCP1 (genes relacionados à termogênese). Além disso, este coativador parece proteger a célula contra danos oxidativos através da interação com Nrf2 (WU *et al.*, 1999; BOSTROM *et al.*, 2012; LA SPADA, 2012; TAN *et al.*, 2016).

O gene PGC1 α está localizado no cromossomo 4 em humanos e codifica uma proteína contendo 798 aminoácidos (HOUTEN; AUWERX, 2004; LERIN *et al.*, 2006). Possui três domínios: N-terminal de ativação, central regulatório e C-terminal de ligação ao RNA (LIN *et al.*, 2005). Assim, após ligação ao fator de transcrição, PGC1 α sofre mudança conformacional que permite a ligação na sua região N-terminal e motivo LXXLL de proteínas que possuem histonas acetil transferases (PUIGSERVER, 2003). No entanto, isto não é suficiente para que PGC1 α seja capaz de promover a transcrição, é ainda necessário que haja acoplamento no domínio C-terminal de um complexo de proteínas conhecido como complexo TRAP/DRIP (PUIGSERVER *et al.*, 1999; WALLBERG *et al.*, 2003). A mudança conformacional ou pós-transcricional deste coativador é o que determina sua atividade e especificidade por um determinado tecido. Em relação à atividade, é aumentada, por exemplo, por desacetilação (RODGERS *et al.*, 2005) e metilação (TEYSSIER *et al.*, 2005) e diminuída por acetilação (LERIN *et al.*, 2006). Já a fosforilação pode promover ambos efeitos dependendo do tecido em que é expresso (JAGER *et al.*, 2007).

PGC1 α pode favorecer a via respiratória por dois diferentes caminhos: aumentando a biogênese mitocondrial, através da indução da expressão de fatores respiratórios

nucleares (NRFs - fatores de transcrição responsáveis pela regulação da expressão de vários genes mitocondriais), ou por indução de modificações da composição intrínseca de cada mitocondria, através da alteração nos níveis ou na atividade de várias enzimas mitocondriais, ou ainda de uma combinação de ambos (AUSTIN; ST-PIERRE, 2012). Considerando que a mitocôndria é a principal fonte de produção de ROS em condições fisiológicas, estudos demonstram que PGC1 α também está relacionado com o aumento da expressão das enzimas antioxidantes responsáveis pela remoção destas espécies, permitindo que as células se adaptem à nova condição metabólica (ST-PIERRE *et al.*, 2003; VALLE *et al.*, 2005; AUSTIN; ST-PIERRE, 2012).

Como mencionado, as células tumorais, em sua grande maioria, utilizam a via glicolítica em detrimento à fosforilação oxidativa para obtenção de energia. Neste contexto, Yin e colaboradores (2004) observaram que a expressão de PGC1 α , o número de cópias de DNA mitocondrial e o conteúdo de proteínas envolvidas na respiração estavam reduzidos em células de CHC, em comparação com os tecidos saudáveis. Os autores sugeriram com isso que a expressão diminuída deste coativador transcricional pode estar envolvida com a hepatocarcinogênese (YIN *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2008). De fato, estudos demonstram que a expressão de PGC1 α está fortemente associada com a progressão do câncer (BHALLA *et al.*, 2011; FISHER *et al.*, 2015), bem como, com resistência das células tumorais a terapêutica empregada (TAN *et al.*, 2016). Nesse sentido, Vellinga e colaboradores (2015) observaram que células de tumor colorretal isoladas de pacientes submetidos à tratamento quimioterápico apresentaram maior dependência da fosforilação oxidativa, o que promove a sobrevivência destas células durante o tratamento. Esta mudança metabólica resulta da ativação de SIRT1/PGC1 α , que por sua vez estimulam a expressão de genes relacionados com a biogênese mitocondrial e fosforilação oxidativa (VELLINGA *et al.*, 2015).

Esta excepcional habilidade do PGC1 α em influenciar o metabolismo celular o torna um importante alvo na busca por quimioterápicos que sejam mais seletivos e que apresentem menos efeitos colaterais.

3.5 Resistência a Múltiplas Drogas e Transportadores ABC

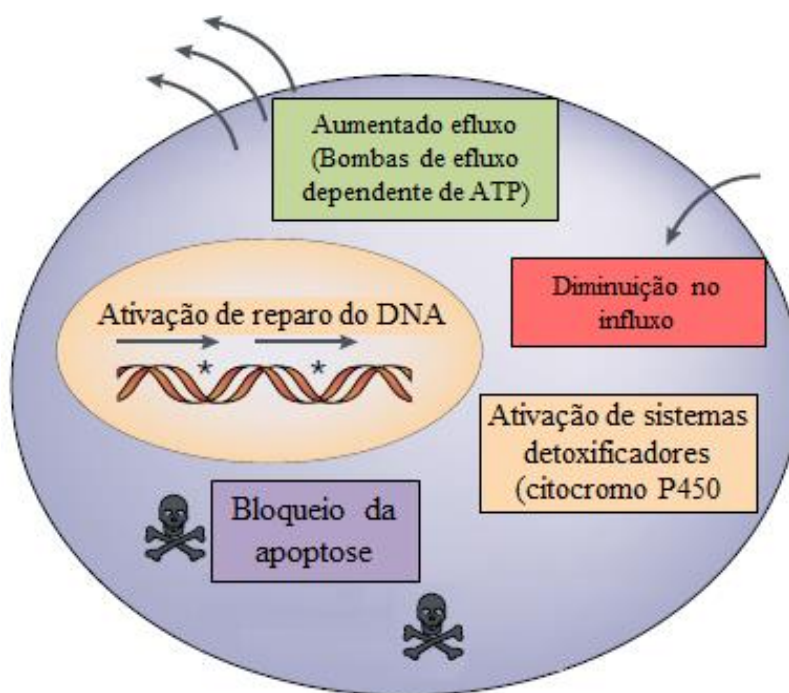
Uma constante preocupação relacionada a utilização de terapia antitumoral é o desenvolvimento ou presença de resistência a múltiplas drogas (MDR) por células tumorais. Este fenótipo está associado com ganho de resistência a uma ampla gama de drogas com diferentes estruturas e alvos celulares, o que pode explicar a inefetividade de tratamentos que combinam diferentes quimioterápicos com diferentes alvos. Dentre os mecanismos propostos para o surgimento deste fenótipo, conforme citado na FIGURA 7, a expressão aumentada de bombas de efluxo de drogas (transportadores da superfamília ABC) é considerada um importante fator (GOTTESMAN *et al.*, 2002; KARTAL-YANDIM *et al.*, 2016).

O surgimento do fenótipo MDR pode ocorrer durante ou após a realização de ciclos de quimioterapia, o que muitas vezes está associado à seleção e posterior clonagem das células resistentes já pré-existentes no tumor. Por outro lado, a exposição aguda a determinados quimioterápicos também pode resultar no aparecimento do fenótipo MDR. Neste caso, acredita-se que o composto atue, pelo menos em parte, diretamente na indução da expressão gênica (ABOLHODA *et al.*, 1999).

Dentre os vários transportadores ABC (48 membros), somente Pg-p, MRP1 e ABCG2 estão associados com o surgimento de MDR *in vivo* (SHAROM, 2008). Pg-p foi o primeiro transportador a ser identificado como uma glicoproteína de membrana com 170-kDa, em células resistentes a colchicina (EJENDAL; HRYCYNA, 2002). Posteriormente,

MRP1 e ABCG2 foram identificados em linhagens de câncer de pulmão e de mama, resistente a doxorubicina e adriamicina, respectivamente.

FIGURA 7: FATORES RELACIONADOS COM A INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A QUIMIOTERAPIA



FONTE: Adaptado de (GOTTESMAN *et al.*, 2002) com autorização de NATURE PUBLISHING GROUP (número de licença 3942670098487)

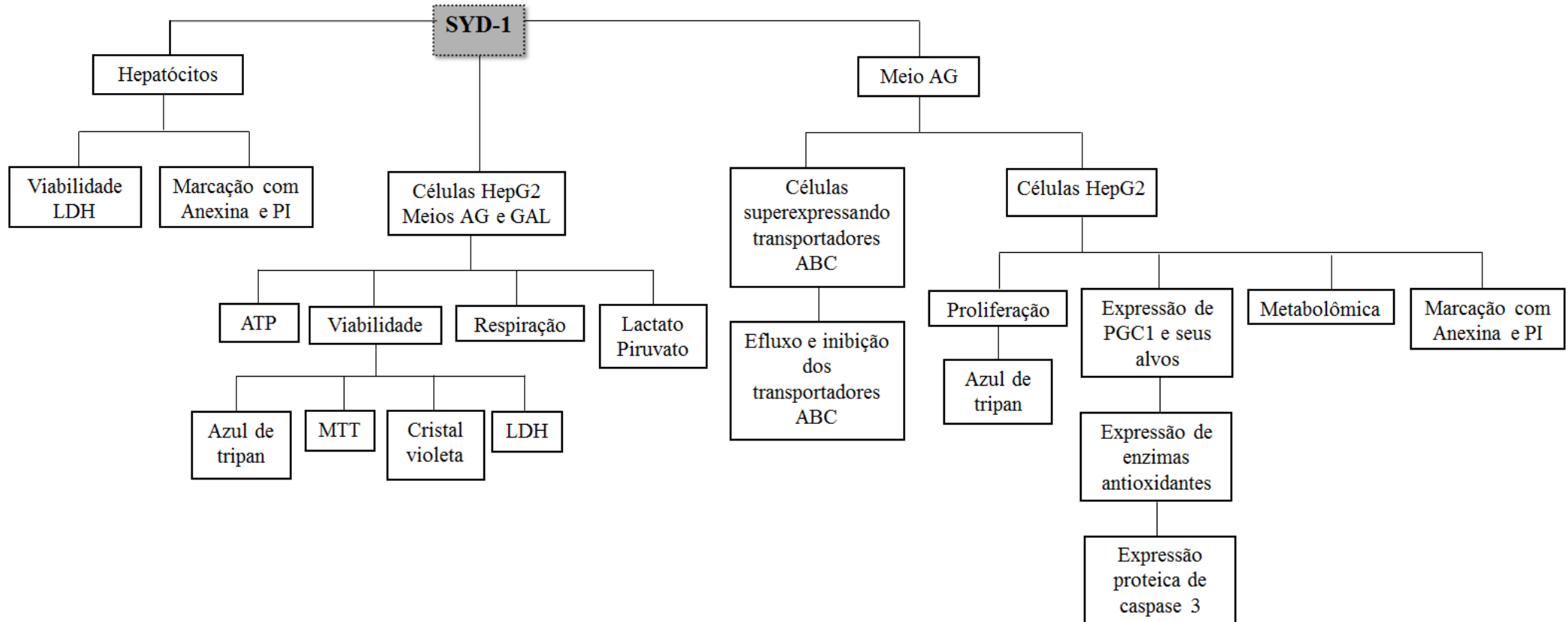
NOTA: As células tumorais podem se tornar resistentes aos quimioterápicos por vários mecanismos. Uma maneira é bombear a droga para o meio externo, diminuindo assim sua concentração intracelular e consequentemente seus efeitos. Isto é possível devido ao aumento da atividade de bombas de efluxo, tais como os transportadores dependentes de ATP (transportadores ABC). Alternativamente, a resistência pode ocorrer como resultado do diminuído influxo de drogas, um mecanismo relatado por exemplo para drogas que entram na célula por meio de endocitose. Nos casos em que o acúmulo de quimioterápicos não é alterada, o mecanismo utilizado para promover a resistência pode ser derivado da ativação de proteínas desintoxicantes como citocromo P450, por meio da ativação de mecanismos de reparo do DNA (induzido pela droga), ou ainda, por alterações na via apoptótica, impedindo a morte celular.

Estruturalmente, todos os transportadores ABC possuem pelo menos um domínio transmembrana (TMD) responsável pela ligação e extrusão do substrato, e um domínio de ligação à nucleotídeo (NBD) encontrado no citoplasma (RICE *et al.*, 2014). Assim, o que os diferencia é a estrutura modular e o número de domínios TMD, que resulta em distinta especificidade por substratos (GOTTESMAN *et al.*, 2002). A hidrólise do ATP, quando da

ligação ao domínio NBD, é que confere energia para que compostos sejam efluxados, diminuindo assim sua concentração intracelular (SHAROM, 2008; MCINTOSH *et al.*, 2016).

Nesse sentido, o uso de inibidores dos transportadores ABC é uma importante estratégia para restauração da sensibilidade de células resistentes aos quimioterápicos. Assim, o bloqueio do efluxo de drogas permitiria seu acúmulo intracelular a níveis capazes de exercer a atividade antitumoral. No entanto, até o momento, nenhum composto foi capaz de reverter o fenótipo MDR sem causar toxicidade (CHEN *et al.*, 2016). Por outro lado, é preciso cautela no uso de inibidores destes transportadores, uma vez que são altamente expressos, de maneira fisiológica, em importantes órgãos como: fígado, rins, intestino, barreira hematoencefálica e hematoplacentária e são responsáveis tanto pela eliminação de toxinas do organismo, quanto por exemplo de hormônios, citocinas e glutatona da célula para o meio circulante (SHAROM, 2008).

4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Reagentes

O composto mesoiônico SYD-1 (3-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olato) foi sintetizado e gentilmente doado pela Professora Dra. Áurea Echevarria do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. O composto teve sua estrutura confirmada por RMN¹H e ¹³C e espectroscopia de massas.

Os reagentes utilizados HEPES, rotenona, ATP, NADH, NAD⁺, FCCP, oligomicina, L-glutamato desidrogenase, MTT, collagenase tipo IV e 1A, glucagon, insulina, fator de crescimento epidermal, tripsina e meio DMEM alta glucose, foram obtidos da Sigma Chemical Co. Os reagentes seguintes foram obtidos dos laboratórios: anexina V – BD, soro fetal bovino e Hepatozyme – Gibco; fosfato de potássio monobásico – Synth; BSA, cloreto de potássio, sacarose, DMSO, Tris e os demais reagentes com alto grau de pureza, foram adquiridos da Merck.

5.2 Preparo da solução de SYD-1

O composto SYD-1 foi diluído em DMSO (100%) de forma a obter soluções estoque concentradas que variaram de 15-50 mM. Estas soluções foram mantidas congeladas a -20⁰C e utilizadas no prazo máximo de 1 mês. Como verificado através de análises de RMN ¹H e ¹³C e espectroscopia de massas, nestas condições de armazenamento, são preservadas as características estruturais do composto por um mês (Echevarria, Comunicação pessoal). Para cada experimento, também foi realizado um ensaio controle com o solvente DMSO (0,01%).

5.3 Hepatócitos isolados de fígado de rato

5.3.1 Animais

Para os experimentos com células hepáticas, foram utilizados ratos machos albinos da raça Wistar, com peso variando entre 180-300g. Os animais foram mantidos no biotério do Setor de Biológicas da UFPR, alimentados com dieta balanceada Purina® e água a vontade, mantendo ciclo claro/escuro de 12 h. Para obtenção do fígado, esses animais foram eutanasiados utilizando uma mistura de dois anestésicos, Cetamina (60 mg/Kg) e Xilazina (7,5 mg/Kg). Os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, com certificação de número 548 (Anexo 1).

5.3.2 Solução de Perfusão

Para perfusão utilizou-se solução de Krebs (20x), constituída de NaCl 2,4 M, KCl 96 mM, KH_2PO_4 24 mM, MgSO_4 24 mM acrescida de NaHCO_3 480 mM e tampão Hepes 1 M, pH 7,4. Os componentes preparados como soluções estoque concentradas, foram autoclavados a 120°C e armazenados em geladeira até o momento do uso, quando foram diluídos (1x) em água bidestilada estéril.

5.3.3 Solução de Isolamento 1 – Hepatócitos

Esta solução foi constituída da solução de perfusão (item 4.3.2), acrescida de CaCl_2 1,3 M (1000x) e collagenase 20 mg/mL. A solução concentrada de CaCl_2 foi igualmente autoclavada a 120°C e armazenada em geladeira até o momento do uso, quando foi diluída (1x) em água bidestilada estéril.

5.3.4 Solução de Isolamento 2 - Hepatócitos

Constituída da solução de isolamento 1 (item 4.3.3) acrescida de BSA 20%.

5.3.5 Meios de cultura para hepatócitos

O meio DMEM AG, adquirido na forma de pó, foi reconstituído para um volume de 1L com água mili-Q e continha 25 mM de glucose e 4 mM de glutamina, entre outros componentes (DULBECCO; FREEMAN, 1959). A esterilização foi realizada por filtração em membrana de 0,22 μ m, em aparelho Sartorius. No momento da utilização, o meio foi aliquotado e suplementado com SFB (3%), insulina (100 nM), glucagon (10 nM), fator de crescimento epidermal (10 ng/mL), dexametasona (50 nM) e o pH ajustado para 7,4 com solução de bicarbonato.

Ainda, para o cultivo de hepatócitos foi utilizado o meio Hepatozyme®, disponível na forma líquida e estéril (pH 7,4). No momento da utilização, o meio foi aliquotado suplementado com glutamina 0,2 mM, penicilina (100 U/mL), e estreptomicina (100 ng/mL), sendo em seguida armazenado sob refrigeração.

5.3.6 Cultura Primária de Hepatócitos

Os hepatócitos foram isolados de fígado de rato de acordo com o método descrito por Seglen 1976, com modificações. O procedimento envolveu a perfusão do órgão com colagenase, realizada no Departamento de Farmacologia da UFPR em colaboração com a Prof. Dra. Alexandra Acco.

Para iniciar o procedimento, o animal foi pesado e anestesiado por via intraperitoneal com a mistura dos anestésicos Cetamina (60 mg/Kg) e Xilazina (7,5 mg/Kg). Após anestesia, procedeu-se a abertura do abdome, isolamento do estômago e cóledoco e a administração de heparina (5000 IU/mL) por via endovenosa (veia cava

caudal), a fim de prevenir a coagulação sanguínea. A veia porta foi então canulada e o fígado perfundido com a solução de isolamento 1 aerada com uma mistura de 95% de O₂ e 5% CO₂ (carbogênio) a 37°C sob um fluxo de 30 mL/min.

Após esta perfusão inicial, canulou-se a veia cava superior e o fígado foi novamente perfundido com a solução de isolamento 1, acrescida de uma mistura de collagenase tipo IA (20 mg) e tipo IV (20 mg). Quando o fígado apresentou os primeiros sinais macroscópicos de perda de integridade tecidual (aproximadamente 10-20 min), o órgão foi cuidadosamente retirado e as células dispersas por ação mecânica. A suspensão celular foi então filtrada em malha de 50 µm para retirar células maiores e a partir de então todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar, em banho de gelo. A suspensão celular foi dividida em duas partes para o processamento que incluiu a adição da solução de isolamento 2, centrifugação a 60 rpm por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* de células foi cuidadosamente ressuspenso em meio de isolamento 2, procedendo-se a nova centrifugação nas mesmas condições. Este processo foi repetido por 4 vezes. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspenso em DMEM alta glucose suplementado (item 4.3.5).

Por fim, foi verificada a viabilidade celular utilizando-se o corante azul de tripan (0,4% p/v) e a suspensão celular semeada em placa de cultura de 60 cm² de diâmetro com meio DMEM alta glucose suplementado. As culturas permaneceram em incubadora a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ para adesão por 4 h. Passado esse tempo, o meio DMEM foi substituído pelo meio Hepatozyme® contendo ou não o composto SYD-1. As células foram mantidas em cultura nas mesmas condições por aproximadamente 18 h, quando foram realizados os experimentos.

5.4 Células HepG2

Todos os procedimentos envolvendo o cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar vertical (VECO). O material de vidro utilizado para a manutenção das culturas, bem como tampas e pipetas foram esterilizadas em autoclave a 120°C e 1 atm de pressão por quarenta e cinco min. O material plástico foi esterilizado em forno de microondas (Eletrolux MEX55) em potência média por 50 min. Após esterilização os materiais foram secos em incubadora a 37°C. Todas as soluções utilizadas foram esterilizadas por filtração em membranas microporosas de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm, marca Millipore, em aparelho Sartorius ou em autoclave a 120°C e 1 atm de pressão por 45 min.

5.4.1 Soluções

5.4.1.1 Solução Salina Tamponada (PBS)

PBS foi preparado como solução estoque cinco vezes concentrada: Na₂HPO₄ 1,15 g/L, KH₂PO₄ 0,2 g/L, NaCl 7,95 g/L e KCl 0,2 g/L, autoclavada a 120°C, 1 atm de pressão, e o pH ajustado para 7,4. Esta solução foi mantida sob refrigeração e no momento do uso diluída (5x) em água ultrapura estéril.

5.4.1.2 Solução Dispersante de Células – Tripsina/EDTA

A solução dispersante de células ou solução de tripsina foi utilizada para soltar as células da garrafa de cultura para os repiques ou coleta para desenvolvimento dos experimentos. Esta solução é constituída de tripsina 2,0 g/L, NaCl 8 g/L, KCl 0,4 g/L, KH₂PO₄ 0,06 g/L, dextrose 1,0 g/L, vermelho de fenol 0,5%, NaHCO₃ 0,195 g/L e EDTA 0,25 g/L. O pH (7,4) desta solução foi ajustado com HCl e sua esterilização feita por meio de filtração em membrana 0,22µm, em aparelho Sartorius e mantida congelada -18°C em

alíquotas. No momento da sua utilização, uma alíquota foi então descongelada em banho-maria a 37°C.

5.4.2 Meios de cultura para células HepG2

5.4.2.1 DMEM AG

Este meio disponível na forma de pó foi resuspenso em água mili-Q e o pH ajustado para 7,4 com solução de bicarbonato. Entre seus componentes estão a glucose (25mM) e glutamina (4 mM). A esterilização foi realizada por filtração em membrana 0,22 µm, em aparelho Sartorius. No momento da utilização, o meio foi aliquotado e suplementado com 10% de SFB inativado, Hepes (20 mM), penicilina (100 U/mL), e estreptomicina (100 ng/mL) estéreis, sendo em seguida mantido sob refrigeração.

5.4.2.1 DMEM GAL

Este meio disponível na forma líquida (500 mL) já estéril, não apresentava glucose em sua composição, mas continha 10 mM de galactose e 4 mM de glutamina. Como suplementação foram adicionados SFB inativado (10%), Hepes 20mM, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 ng/mL) e 2 mM de glutamina, sendo mantido sob refrigeração.

5.4.3 Cultura de células HepG2

As células HepG2 foram provenientes da American Type Culture Collection e adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ, Rio de Janeiro, na passagem 85. Estas células crescem em monocamadas, sua morfologia é de natureza epitelial e diferem dos hepatócitos quanto a expressão de proteínas e fatores tumorais, possuindo tempo médio de dobramento de 20 h (NATARAJAN; DARROUDI, 1991).

O cultivo foi realizado em incubadora em atmosfera de 5% de CO₂ para adesão, crescimento e replicação celular. Os repiques celulares foram realizados de 48-72 h, mantendo-se sempre a confluência celular máxima de 80%. Todos os reagentes utilizados para os repiques foram pré-aquecidos em banho maria a 37°C. Após retirar o meio de cultura, a monocamada celular foi lavada com PBS e adicionou-se solução de tripsina-EDTA (~3 mL) por 5 min. Decorrido este tempo, a solução dispersante foi removida cuidadosamente e acrescentou-se meio de cultura (10 mL) para desaderir as células da superfície da garrafa. A suspensão foi então transferida para uma nova garrafa de cultura de capacidade superior à anterior, sendo adicionado meio de cultura até o volume final correspondente à sua capacidade.

A mudança para o meio GAL foi realizada de forma gradual. As células foram mantidas neste novo meio por quinze dias antes do início dos ensaios. Após este tempo, as células crescidas tanto em meio AG quanto GAL foram semeadas em placas de capacidade adequada para a realização dos experimentos.

5.5 Cultura de células HEK293 e NIH3T3 parentais e superexpressando os principais transportadores ABC

Para os experimentos com transportadores de multidroga, foram utilizadas células embrionárias de rim humano HEK293 e sua parental estavelmente transfectada com *ABCG2* (HEK293*ABCG2*) (VALDAMERI *et al.*, 2012) ou *MRP1* (HEK293*ABCC1*), ou ainda, vetor vazio (HEK293*pcDNA5*), e fibroblastos embrionários de camundongo, quer de tipo selvagem (NIH3T3) ou superexpressando Pgp (NIH3T3*ABCB1*) (MARTINEZ *et al.*, 2014), que foram mantidas a 37°C (5% CO₂) em meio DMEM AG suplementado com 10% de SFB, 1% penicilina/estreptomicina.

Os meios de cultura celular foram suplementados com 0,75 mg/mL G418 (HEK293*ABCG2*), 200 µg/mL higromicina B (HEK293*pcDNA5* and HEK293*ABCC1*) ou

60 ng/mL colchicin (NIH3T3*ABCB1*). As três linhagens de células transfectadas especificamente superexpressando o correspondente transportador de múltiplas drogas ABC, foram denominadas como Pgp (CARDARELLI *et al.*, 1995), MRP1(MARCHAN *et al.*, 2008) e ABCG2 (ROBEY RW, 2003).

A coleta destas células foi feita por tripsinização. Inicialmente foi retirado o meio de cultura e a monocamada de células lavada com PBS. Em seguida, foram adicionados a solução de tripsina-EDTA e, após o descolamento das células, meio de cultura. O número de células nesta suspensão celular foi determinado em hemocítômetro NEUBAUER, utilizando-se o valor correspondente à média das duas Câmaras, com auxílio de microscópio invertido Olympus.

5.6 Métodos Analíticos

5.6.1 Determinação da viabilidade celular

5.6.1.1 Redução do MTT

Este método colorimétrico baseia-se na capacidade de células viáveis e metabolicamente ativas reduzirem o MTT, que possui coloração amarela, a sais de formazam de cor púrpura, que podem ser quantificados por espectrofotometria após dissolução com DMSO (MOSMANN, 1983).

No procedimento, após plaqueamento, as células de HepG2 (1×10^4) células por poço em placas de 96 poços), foram incubadas para adesão a 37°C e 5% de CO₂ por 24 h, em meio DMEM AG ou GAL. Decorrido este tempo, foram realizados os tratamentos com o SYD-1 nas concentrações 0-50 µM por 24 h. Findado o tempo de tratamento, as células foram lavadas com HBSS (NaCl 2,73 mM, KCl 107 mM, CaCl₂ 25 mM, MgSO₄.7H₂O 27 mM, Na₂HPO₄ 8,5 mM e glucose 110 mM, pH 7,4) e acrescentados 20 µL de MTT (5mg/mL) por poço, seguindo-se incubação por 3 h a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. A

seguir, o MTT foi removido, e os cristais de formazam dissolvidos pela adição de 200 μ L de DMSO. Após homogeneização a absorbância foi lida em leitor de microplacas Tecan Infinite M200, em comprimento de onda de 550nm. A porcentagem de células viáveis após o tratamento em relação às células não tratadas (controle) foi calculada conforme a equação abaixo:

$$\text{Porcentagem de células viáveis} = \frac{\text{Abs. das células tratadas com SYD} \times 100}{\text{Abs. das células não tratadas}}$$

Para os experimentos com células resistentes a multidrogas, esta metodologia foi utilizada para determinar o IG_{50} . Para o plaqueamento em placa de 96 poços foram utilizadas diferentes densidades celulares para cada célula: 1×10^4 , $3,5 \times 10^3$ e $5,0 \times 10^3$ células por poço para HEK293, NIH-3T3 e NIH-3T3ABCB, respectivamente. Após adesão por 24 h a 37°C e atmosfera de 5% CO_2 . Após este período, as células foram tratadas com SYD-1 por 72 h e adicionados 20 μ L da solução de MTT (5 mg/mL), seguindo-se nova incubação nas mesmas condições por 4 h. Descartou-se então o meio e adicionou-se solução de DMSO: etanol (1:1) em cada poço, seguindo-se agitação suave por 10 min. Por fim, a absorbância foi lida em 570 nm em leitor de microplaca TecanInfinite M200.

5.6.1.2 Atividade da LDH no meio de cultura

A lactato desidrogenase catalisa a redução do piruvato a lactato com a concomitante oxidação do NADH a NAD^+ . O decréscimo da absorbância em 340nm decorrente desta oxidação é proporcional a atividade da LDH na amostra.

Para este ensaio foi utilizado como amostra o sobrenadante do ensaio de viabilidade MTT (item 4.6.11). O meio foi coletado, centrifugado a 2.550 g por 5 min e a atividade da

enzima foi determinada utilizando Kit LABTEST[®], conforme as orientações do fabricante. Os resultados foram apresentados como porcentagem de LDH liberada em relação ao controle (sem tratamento).

5.6.1.3 Coloração com Cristal Violeta

Este método baseia-se na propriedade do corante de ligar-se ao DNA de células que se encontram aderidas à placa, consideradas como células viáveis (SAOTOME *et al.*, 1989).

Para o procedimento, após plaqueamento das células de HepG2 (1×10^4 células por poço) em placas de 96 poços, estas foram incubadas para adesão a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h, em meio DMEM AG ou GAL. Decorrido este tempo, foram realizados os tratamentos com o SYD-1 em diferentes concentrações (0-50 µM) por 24 h. Findado o tempo de tratamento, as células foram lavadas com PBS e fixadas com metanol (100%) por 10 min. Após, foi adicionado o corante cristal violeta (preparado 0,2% em etanol 2%) no fundo do poço, seguindo-se incubação por 2-3 min. Decorrido este tempo, o corante foi retirado e as células lavadas exaustivamente com PBS. Em seguida, o corante retido nas células foi eluído com 200 µL de citrato de sódio 0,05 M (preparado em etanol 50%). Após homogeneização a absorbância foi lida em leitor de microplacas Epochi, em comprimento de onda de 550nm. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle (não tratado).

5.6.1.4 Coloração com Azul de Tripan

A viabilidade celular por esta metodologia foi determinada segundo Tennant (TENNANT, 1964). Esta técnica avalia a integridade da membrana celular, uma vez que o corante azul de tripan é permeável somente em células cujas membranas estejam permeáveis, ou seja, em células não viáveis, que são coradas em azul.

As células HepG2 ($0,3 \times 10^6$) foram plaqueadas em placa de 6 poços e deixadas aderir por 24 h em incubadora a 37°C e atmosfera de 5% CO_2 . Após esse tempo foi feito o tratamento com SYD-1 (0-50 μM) por 24, 48 e 72 h. Após o final de cada tempo de tratamento, o sobrenadante foi coletado e mantido em banho de gelo. A monocamada de células foi tripsinizada e as células soltas foram adicionadas ao sobrenadante coletado, seguindo-se centrifugação a 1500 rpm por 5 min (microcentrífuga eppendorf 5424R). As células foram ressuspensas em meio AG e para cada mL da suspensão celular de HepG2 foi utilizado 0,1 mL da solução do corante azul de tripan (0,4% p/v), sendo efetuada a contagem em contador automático TC10. A partir desta contagem, o aparelho disponibiliza os valores correspondentes aos parâmetros de viabilidade (% de células não coradas em relação o número de células totais) e a proliferação (número de células não coradas).

Para os hepatócitos, esta metodologia foi aplicada logo após a obtenção das células, com o objetivo de determinar a eficiência do processo de isolamento. A concentração do azul de tripan foi a mesma utilizada para as células HepG2 e a contagem foi realizada utilizando hemocítômetro de NEUBAUER.

5.6.2 Respiração Celular

A respiração celular foi determinada em células HepG2 aderidas ou em suspensão, mantidas em meio AG ou GAL, tratadas ou não com o SYD-1 (0-50 μM) por 24 h ou 2 min de incubação, respectivamente. Os ensaios com as células em suspensão foram motivados por resultados anteriores, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, que evidenciaram o comprometimento da fosforilação oxidativa pelo SYD-1 após 2 min de tratamento.

Para as análises em células HepG2 aderidas, estas foram semeadas (1×10^6 células) em placas de 60 mm. Após adesão a 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 e tratamento com o SYD-1 (24 h), as células foram lavadas com PBS e desaderidas com o uso de solução tripsina/EDTA.

O consumo de oxigênio foi monitorado por respirometria de alta resolução (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria). As medições foram feitas em duas câmaras a 37°C, sob suave agitação. O consumo de oxigênio foi avaliado em diferentes estados da respiração (GNAIGER, 2001; RENNER *et al.*, 2003; HUTTER *et al.*, 2006; GNAIGER, 2009; SCANDURRA; GNAIGER, 2010) definidos como: **Basal** - consumo de oxigênio na ausência de inibidores ou desacopladores-, que reflete a respiração em condições basais de cultivo; **Leak** -a respiração na presença de oligomicina 2 µg/mL-, que corresponde a respiração em resposta ao vazamento de prótons; **Desacoplado** -respiração na presença de desacoplador FCCP (1 µmol/L) -, que reflete o transporte de elétrons no estado desacoplado da fosforilação oxidativa. O fluxo de oxigênio nestes estados foi corrigido pela subtração da respiração mitocondrial obtida após a adição de rotenona (1 µmol/L) e antimicina (6 µg/mL). Os resultados foram normalizados pela concentração de proteína e expressos como porcentagem em relação ao controle.

Para os experimentos com as células em suspensão, a metodologia foi semelhante, com a diferença de que as células HepG2 foram primeiramente cultivadas até aproximadamente 90% de confluência, coletadas por tripsinização, contadas e ressuspensas em meio de cultura (1×10^6 células/mL). Em seguida, a suspensão celular foi transferida para as câmaras do oxígrafo para a determinação da respiração na ausência (controle) ou presença de SYD-1 (2 min de pré-incubação). Os resultados foram expressos como fluxo de oxigênio/células [pmol/(seg $\times 10^6$ células)].

5.6.3 Determinação dos níveis de Lactato e Piruvato

As concentrações de lactato e piruvato no meio extracelular foram determinadas para as células aderidas e em suspensão, segundo Gutmann e Czoc (1974).

O sistema para dosagem de lactato, em volume final de 300 µL, foi constituído de tampão glicina 0,1 mol/L e hidrazina 0,4 mol/L em pH 9,5, NAD⁺ 1,5 mmol/L, Lactato

desidrogenase 1,5 U e 150 μ L do sobrenadante. A quantidade de NADH foi determinada a 340nm em leitor de microplacas, após 90 min de incubação a 37°C. Os resultados foram expressos em nmol/mL sendo a quantidade de lactato calculado a partir do coeficiente de extinção molar do NADH $\epsilon = 6220 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Os níveis de piruvato foram determinados em volume final de 300 μ L, em meio de reação contendo Tris-HCl 0,1 M em pH 7,0, NADH 0,15 mM, lactato desidrogenase 0,05 U e 150 μ L do sobrenadante. A oxidação do NADH foi acompanhada a 340nm em leitor de microplacas, após 20 min de incubação a 37°C. Os resultados foram expressos em nmol/mL sendo a quantidade de piruvato calculada a partir do coeficiente de extinção molar do NADH $\epsilon = 6220 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

As determinações das concentrações de lactato e piruvato nas células aderidas foram realizadas nos sobrenadantes das células tratadas ou não com SYD-1 (25, 35 e 50 μ M por 24 h), após centrifugação a 1700 g por 1 min. Já para as células em suspensão, as mesmas foram coletadas por tripsinização, resuspensas em PBS e incubadas por 2 min com o SYD-1 em diferentes concentrações, a 37°C sob agitação. Após esse período, adicionou-se glucose (5 mM) e alíquotas foram coletadas nos tempos 0, 20 e 40 min. Imediatamente após a coleta, a suspensão celular foi centrifugada por 1 min a 1700 g e no sobrenadante foram dosados lactato e piruvato, como descrito. Os resultados foram expressos em nmol/(10^6 células \times mL⁻¹) sendo a quantidade de piruvato e lactato calculados a partir do coeficiente de extinção molar do NADH $\epsilon = 6220 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ (I. GUTMANN, 1974; R. CZOC, 1974).

5.6.4 Determinação dos Níveis de ATP

Os níveis de ATP foram mensurados pelo kit de ensaio de ATP Bioluminescente da Sigma-Aldrich (FLAA). O ensaio é baseado na oxidação da D-luciferina catalisada pela

enzima luciferase de vaga-lume, que consome ATP com concomitante emissão de luz. Para este ensaio, as células HepG2 (1×10^6 por placa de 60 mm) foram inicialmente cultivadas em meio AG ou GAL e tratadas com SYD-1 (0, 25 e 50 μM) por 24 h. Posteriormente as culturas foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas (1500 rpm por 5 min – Centrífuga Excelsa baby Famem Ltda, velocidade 3), seguindo-se as recomendações do fabricante. A bioluminescência foi quantificada com leitor de microplaca TECAN infinity, e a concentração de ATP intracelular ($\mu\text{mol} \times \text{mg protein}^{-1}$) foi calculada utilizando uma curva padrão de ATP (0 a 1,25 $\mu\text{mol/mL}$).

5.6.5 Análise do transporte ou inibição dos transportadores ABC pelo SYD-1

As células HEK293ABCG2 foram semeadas a uma densidade de 1×10^5 células/poço em placas de 24 poços. Após 72 h de incubação, foram expostas a 5 μM de mitoxantrona durante 30 min a 37°C , na presença ou ausência de SYD-1 (25 μM), e, em seguida, lavadas com PBS e tripsinizadas. A fluorescência intracelular foi monitorada com citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson). A porcentagem de inibição foi calculada relativamente ao Ko143 (1 μM - 100% de inibição). As células NIH-3T3ABCB1 foram plaqueadas a uma densidade de 6×10^4 células/poço em placas de 24 poços e incubadas por 48 h a 37°C , enquanto que para as células HEK293 transfectadas com ABCC1 foram utilizadas $2,5 \times 10^5$ células/poço e tempo de incubação de 72 h. As células NIH-3T3ABCB1 e HEK293ABCC1 foram, respectivamente, expostas a rodamina 123 (0,5 μM) ou calceína-AM (0,2 μM) durante 30 min a 37°C , na presença ou ausência de SYD-1, sendo posteriormente lavadas com PBS e tripsinizadas. A fluorescência intracelular foi monitorada por citometria. A inibição foi medida relativamente à GF120918 (5 μM - NIH-3T3ABCB1) ou verapamil (35 μM - HEK293ABCC1), respectivamente.

A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = (C - M) / (C_{ev} - M) \times 100,$$

em que **C** corresponde à fluorescência intracelular de células resistentes na presença de compostos e substrato fluorescente, **M** corresponde à fluorescência intracelular de células resistentes, somente com o substrato fluorescente, e C_{ev} corresponde à fluorescência intracelular de células na presença de inibidor padrão e substrato fluorescente.

5.6.6 Marcação com anexina e PI - Análise de morte celular

A análise de uma possível indução de morte celular pelo SYD-1 foi realizada através de dupla marcação com Iodeto de propídio (PI) e Anexina V-FITC. Os hepatócitos, foram plaqueados (1×10^6) em placas de 6 poços e tratados por 18 h com SYD-1 (25 e 50 μ M). Após o tratamento, as culturas foram lavadas com PBS e adicionou-se tampão de ligação (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 5mM, $MgCl_2$ 1 mM, $CaCl_2$ 1,8 mM, pH7,4) contendo AnexinaV-FITC (5 μ L), seguindo-se incubação no escuro por 10 min. Finalmente, foi adicionado PI (0,08 μ M) e as imagens foram imediatamente capturadas por microscópio de fluorescência invertido Axiovert 40CSFL (aumento de $10 \times$).

Para a linhagem de células HepG2, foi utilizado o número de 1×10^6 células por placa de 60 mm que foram incubadas com SYD-1 (25, 35 e 50 μ M) a $37^\circ C$ e atmosfera de 5% de CO_2 por 24 h. Em seguida, as culturas foram lavadas com PBS e tripsinizadas. O sobrenadante, o lavado e as células foram recolhidos em tubo falcon, seguindo-se centrifugação (1500 rpm por 5 min - Centrífuga Excelsa baby Famem Ltda, velocidade 3) e ressuspensão das células em em tampão de ligação, sendo mantidas em banho de gelo. Anexina V-FITC (5 μ L) e solução de PI (1 μ g/ml) foram então adicionados aos tubos falcons, que permaneceram por 10 min no escuro. A análise foi realizada utilizando

aparelho FACSCalibur (BD) e o programa Cell Quest. A aquisição de dados foi feita usando os filtros FL1 e FL2 e analisadas como dotplot através do software WinMDI 2.9.

5.6.7 Análise dos níveis de mRNA (PGC1 e seus alvos; enzimas antioxidantes)

O RNA total de células HepG2 (cultivadas em meio AG), crescidas até ~70% de confluência e tratadas ou não com SYD-1 (0-50 μ M por 24 ou 72 h), foi extraído utilizando o kit Aurum Total RNA Mini Kit (Bio-Rad) e reversamente transcrito com o kit iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad). A análise da expressão de RNAm por PCR em tempo real foi realizada utilizando o iQ SYBRGreen Supermix (Bio-Rad) e primers específicos para cada gene (TABELA 1). Para detecção foi usado o MyiQ2 Real-Time Detection System (Bio-Rad). No equipamento, a reação foi iniciada com temperatura de *holding* de 95°C, durante 3 min. Em seguida, foram realizados 40 ciclos de amplificação (95° C - 30 seg; 57°C - 30 seg, 72°C – 30 seg). Após a ciclagem, foi realizado o *melting* da reação, com temperatura variando de 57 a 95°C. Para a expressão relativa dos genes alvo, inicialmente foi realizado um *screening* com diferentes genes, com o objetivo de determinar o gene cuja expressão não era afetada pelo SYD-1. A partir dos resultados deste screening escolheu-se o gene de ligação TBP para a normalização da expressão dos demais genes afetados pelo SYD-1.

TABELA 1: PRIMERS UTILIZADOS PARA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL

Gene	F: Sequência (5'- 3')	R: Sequência (5'- 3')
<i>PPARGC1A</i> (<i>PGC1α</i>)	CCTGTGATGCTTTTGCTGCTCTTG	AAACTATCAAAATCCAGAGAGTCA
<i>PPARGC1B</i> (<i>PGC1β</i>)	GTACATTCAAATCTCTCCAGCGACATG	GAGGGCTCGTTGCGCTTCCTCAGGGCAG
<i>ESRRA</i>	GCTGCCCTGCTGCAACTAGTG	GCCGCCGCTCAGCACCCCCTC
<i>ATP5J</i>	CGTGCAGCGTCTCTCCGGAATC	AGCTCCCTCTCCAGCTCTTGCT
<i>NDUFB5</i>	CCGAAGGCTGCTGCTCCTGT	TCCCAGTGTTCTGGGACATAGCCT
<i>SOD1</i>	GGCATCATCAATTTTCGAGCA	GGCCTTCAGTCAGTCCTTT
<i>SOD2</i>	GCTGCTCTATTGTAGCATTTCT	CATCCCTACAAGTCCCCAAA
<i>SOD3</i>	AGAGAAAGCTCTCTTGGAGGA	GGCGTACATGTCTCGGAT
<i>NFE2L1</i> (<i>NFR1</i>)	CCAGACAAGTGGGAGTGAAA	ATTCAAAGTGGGGAAAAAAGTGC
<i>NFE2L2</i> (<i>NFR2</i>)	CGCAATTGCTATTTTCCCCA	GCCGAAGAAACCTCATTGTC

<i>CAT</i>	GACAATCAGGGTGGTGCTCC	GAATCGCATTCTTAGGCTTCTC
<i>PRX3</i>	CCTTTGGATTTCACCTTTGTGTG	CAAACCACCATTCCTTTCTTGGTG
<i>PRX5</i>	CCAATCAAGGTGGGAGATGCC	GCAGGTGTGTCTTGGAAACATC
<i>GSS</i>	CCTGGCTGAGGGAGTATTG	TTTGATGGTGCTGGAAAGAGT
<i>GPX3</i>	GGGGACAAGAGAAGTCGAA	AGGGCTCCGTACTCGTAAAT
<i>GCLC</i>	GGACAAACCCAAACCATCCT	TGAACCCAGGACAGCCTAAT
<i>TRX2</i>	GTCCACACCACTGTGCGTGG	TTGCAGGGAGATGGCTCAGCG
<i>TBP</i>	TGCCACGCCAGCTTCGGAGA	ACCGCAGCAAACCGCTTGGG

5.6.8 Análise Metabolômica

As células HepG2 foram cultivadas com meio DMEM AG em placas de 6 poços até ~70%–80% de confluência e tratadas com SYD-1 (10, 25 e 50 μM) por 24 h. Após esse tempo, o meio de cultura foi descartado e as placas foram lavadas com PBS estéril, e incubadas por 45 min em meio DMEM livre de glucose e glutamina, suplementado com 10% de SFB dializado, HEPES 20 mM, piruvato de sódio 1 mM, L-glutamina 2 mM, glucose 25 mM glucose, insulina 10 $\mu\text{g/mL}$, U- ^{13}C -D-glucose ou U- ^{13}C -glutamina 10 mM. Em seguida, o meio foi aspirado, as células foram lavadas com 2 mL de solução salina (NaCl 9 g/L, 4 $^{\circ}\text{C}$) e adicionado em cada poço 300 μL de MeOH 80% (mantido em gelo seco). As células foram então soltas nesse meio com auxílio de um *scraper*. Este processo foi repetido por duas vezes. As soluções contendo as células foram transferidas para tubos plásticos, sonicadas por 10 min e centrifugadas a -4 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min (20.590 g). Aos sobrenadantes foi adicionado 10 μL de ácido mirístico e para evaporação, foram mantidos por ~12 h em centrífuga centri-trap (Labconco). As células depositadas foram ressuspensas em 30 μL hidrocloreto de metoxiamina dissolvidos em piridina anidro. Em seguida procedeu-se a nova sonicação e centrifugação a (240 g por 10 min) e as células foram incubadas a 70 $^{\circ}\text{C}$ por 30 min em tubos de injeção lacrados. Por fim, 70 μL de MTBSTFA (Sigma, 375934) foram adicionados aos tubos e as amostras aquecidas a 70 $^{\circ}\text{C}$ por 1 h. A injeção e análise por GC/MS foram realizadas conforme descrito previamente, usando aparelho e software Agilent (MORITA *et al.*, 2013).

5.6.9. Análise da expressão protéica

Para a análise de expressão da proteína caspase 3, as células HepG2 (1×10^6) foram plaqueadas em placa de 60 mm e deixadas aderir por 24 h em incubadora a 37°C e atmosfera de 5% CO₂. Após esse tempo, as culturas foram tratadas com SYD-1 (0-50 µM) por 24 h. Os extratos celulares foram preparados em tampão de lise RIPA+ constituído de: 150 mM NaCl, 10 mM tris-HCl pH 7,5, desoxicolato de sódio a 1%, triton X-100 a 1%, SDS a 1%, 1 mM PMSF, coquetel de inibidor de fosfatase B - Santa Cruz Biotechnology. Para o ensaio de Western Blotting foram utilizadas alíquotas com 50 µg de proteína para eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS PAGE 12%. Às amostras, foi adicionado Tampão de Amostra Redutor (Solução 5x: 300mM Tris-HCl pH 6,8, glicerol 50%, SDS 10%, β- mercaptoetanol 25%, azul de bromofenol 0,05%) e estas então foram aquecidas a 100°C durante 10 min e posteriormente resfriadas por 5 min. A eletroforese foi realizada durante 3 h (Tampão de Corrida: 25 mM Tris-HCl pH 8,3, glicina 192 mM, SDS 1%), 90V, 400mA. O marcador de peso molecular utilizado foi PagerulerPlus™ 10 - 250kDa (Fermentas Biotech). Após a eletroforese, as proteínas do gel SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de PVDF (Amersham Hybond™ -P, GE Healthcare) através de transferência semi-seca em equipamento modelo T77 (GE Healthcare), 80V durante 1h (Tampão de Transferência: 48 mM Tris-HCl pH 8,3, glicina 39 mM, SDS 0,037%, metanol 20%). A visualização da transferência foi realizada através da coloração da membrana com solução de Ponceau (Bio Agency) e a membrana foi descorada através de lavagens sucessivas com tampão TBST (50 mM Tris-HCl pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%). A ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 1h com solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado ou 5% de BSA em TBST) em temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário contra Caspase-3 (1:500 Cell Signaling, # 9662S) ou

GAPDH (1:500 Sigma-Aldrich, G6545), sob agitação branda seguindo instruções do fabricante. Posteriormente, o excesso de anticorpo primário foi retirado após lavagem da membrana (4x com TBST, 15 min) e esta foi incubada com anticorpo secundário por 1h em temperatura ambiente. Novamente, após a incubação, a membrana foi submetida a lavagens (4x com TBST, 15 min) e então foi preparada para revelação em fotodocumentador da GE Healthcare Life Sciences “Amersham 600”.

5.6.10 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada através da metodologia descrita por Bradford, e como padrão utilizou-se BSA (BRADFORD, 1976).

5.7 Análise estatística

Os resultados, expressos como média \pm S.E.M para as células HepG2 e média \pm S.D para hepatócitos, foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação entre os grupos, utilizando o software Prisma Graph6[®]. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora a atividade citotóxica e antitumoral do SYD-1 tenha sido descrita para diferentes linhagens celulares (GRYNBERG *et al.*, 1992; DUNKLEY; THOMAN, 2003), seu mecanismo de ação bem como seus efeitos sobre células não tumorais ainda não foram descritos. Isto motivou a realização deste estudo em hepatócitos isolados de fígado de rato e células tumorais de hepatocarcinoma humano (HepG2).

As células HepG2 possuem um crescimento contínuo, e em relação à cultura primária de hepatócitos, suas condições de cultivo são mais simples e estabelecidas com maior facilidade (ADEN *et al.*, 1979; BOKHARI *et al.*, 2007). No entanto, esta linhagem apresenta níveis inferiores das enzimas de metabolização de fase I ou citocromos P450, que estão diretamente envolvidas nos processos de metabolismo de drogas e xenobióticos (GOMEZ-LECHON *et al.*, 2014). Estas enzimas são responsáveis por adicionar um grupo funcional (OH, SH ou NH₂) ao substrato através de reações de hidrólise, de oxidação ou de redução. Posteriormente, em uma segunda fase, estes grupos funcionais são modificados por conjugação a grupos metil, acetil ou glicil, de maneira a aumentar sua solubilidade e facilitar sua excreção, promovendo, assim, a detoxificação no fígado (RODRIGUEZ-ANTONA *et al.*, 2002; WESTERINK; SCHOONEN, 2007; DONATO *et al.*, 2008).

Os hepatócitos em cultura, por sua vez, são células totalmente competentes, que mantêm a expressão de enzimas tanto de fase I quanto de fase II e são capazes de apresentar um perfil de absorção e metabolização muito similar ao encontrado *in vivo*. No entanto, sua obtenção e manutenção em cultura apresentam uma série de dificuldades, como o alto custo de manutenção, uma vez que são necessários meios de cultura e reagentes específicos (SEGLEN, 1976; SHIRYAEVA *et al.*, 2008). Somado a isso, a utilização de material humano proveniente de biópsias é desestimulado devido a dificuldade de obtenção do tecido, da necessidade de um imediato processamento - o que

nem sempre é possível considerando que as amostras são obtidas em ambiente hospitalar -, e da grande variação encontrada entre as amostras. Desta forma, neste estudo foi utilizado como modelo cultura primária de hepatócitos murino.

6.1 Efeitos do SYD-1 em Hepatócitos não tumorais

Os hepatócitos obtidos por perfusão de fígado de rato (item 5.3.6 de materiais e métodos), apresentaram viabilidade superior a 85%, conforme determinado pelo método do azul de tripan (dados não mostrados). As culturas foram mantidas por 4 h para adesão e posteriormente tratadas com SYD-1 (25 e 50 μ M) por 18 h.

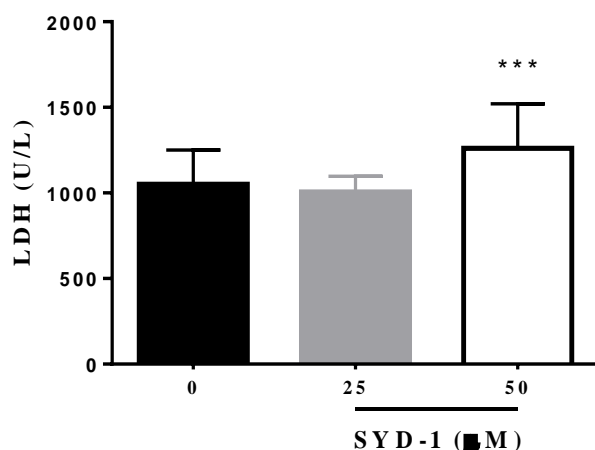
6.1.1 Viabilidade

Em estudo anterior, a viabilidade de hepatócitos frente a diferentes concentrações e tempos de incubação com o SYD-1 foi determinada pelo método do MTT. A partir daqueles resultados foram estabelecidas as concentrações de 25 e 50 μ M e tempo de incubação de 24 h para os ensaios subsequentes (BRANDT, 2012). No entanto, como o MTT baseia-se na atividade de desidrogenases celulares e o SYD-1 compromete a fosforilação oxidativa, optou-se neste estudo por avaliar a viabilidade através da determinação da atividade da LDH no meio de cultura. Como mencionado, a LDH é uma proteína tetramérica, citosólica, que participa da última etapa da glicólise anaeróbia e catalisa a redução reversível do piruvato a lactato com a oxidação do NADH a NAD⁺. Por ser uma enzima de localização essencialmente intracelular, quando seus níveis estão elevados no meio de cultura é um indicativo de comprometimento da integridade da membrana plasmática e, conseqüentemente, de morte celular.

Observa-se na FIGURA 8 que não houve diferença significativa na liberação de LDH em hepatócitos para a menor concentração de SYD-1 (25 μ M). No entanto, um significativo comprometimento da viabilidade ocorreu na maior concentração do composto

(50 μM) com o aumento de $\sim 19\%$ na liberação de LDH. Este resultado sugere que o mesoiônico na menor concentração não é tóxico para estas células.

FIGURA 8: EFEITO DO SYD-1 SOBRE A LIBERAÇÃO DE LDH EM HEPATÓCITOS



FONTE: O autor (2016)

Nota: As condições experimentais estão descritas no item 5.6.1.2 da sessão de Materiais e Métodos. Os hepatócitos foram plaqueados (1×10^6 células por placa) em placas de 60 mm e deixados para adesão em incubadora a 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 por 4 h. Posteriormente foi trocado o meio e realizado o tratamento com SYD-1 nas concentrações de 25 e 50 μM pelo tempo de 18 h. A seguir, o sobrenadante foi coletado, centrifugado e determinada atividade da LDH a 340nm. Como controle foi utilizado tratamento com DMSO (0,01%). Os resultados estão expressos como média \pm SD de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. *** Significativamente diferente do controle ao nível de $p < 0,001$.

6.1.2 Morte Celular

Uma vez que o SYD-1, na maior concentração (50 μM), foi tóxico para os hepatócitos, conforme observado previamente pela redução na viabilidade, alterações na morfologia e inibição da respiração destas células (BRANDT, 2012), ensaios utilizando marcação com anexina V-FITC e PI foram realizados para identificar a possível via de morte induzida pelo composto.

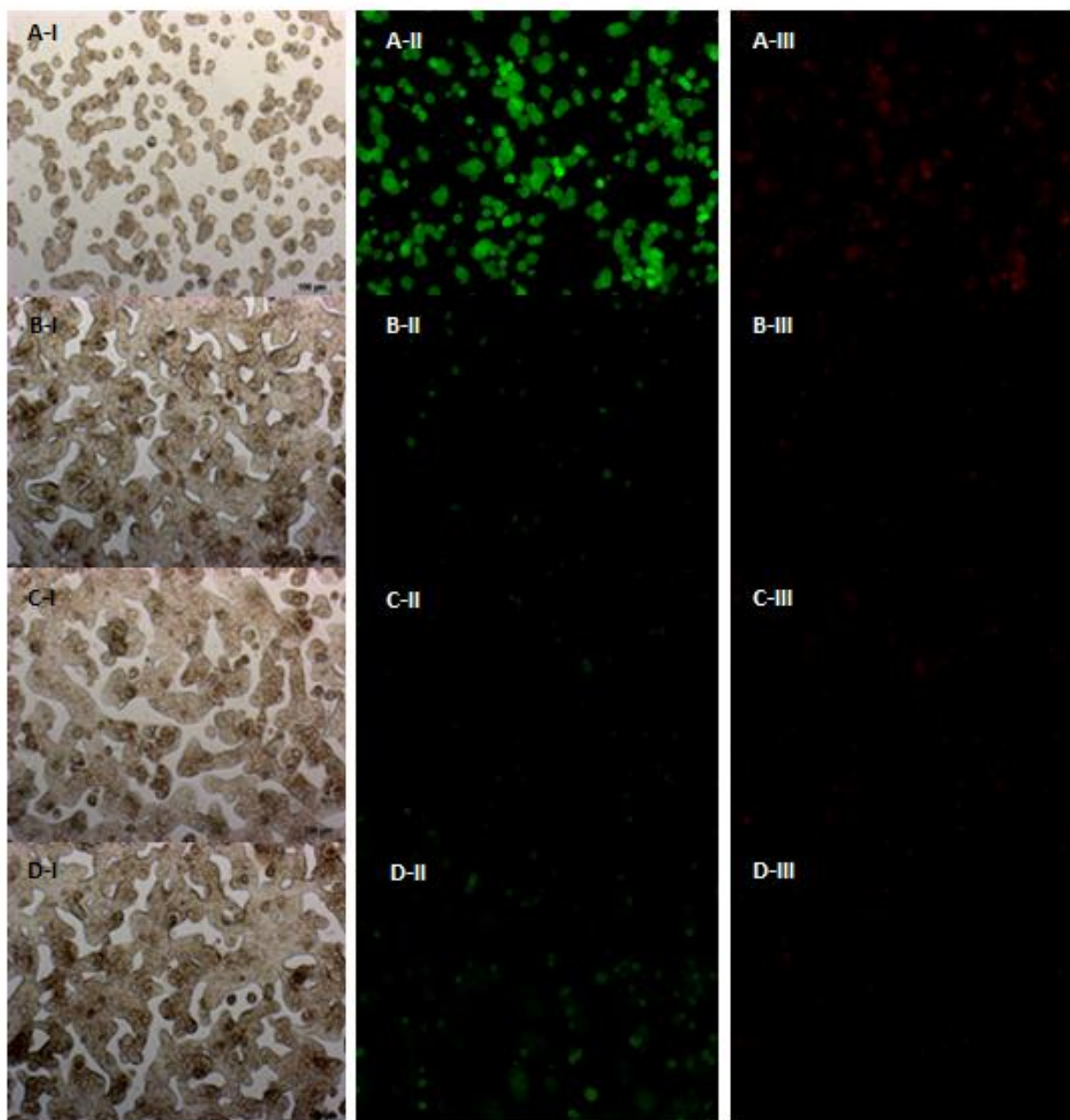
A Anexina V é uma proteína que têm alta afinidade de ligação ao fosfolípido de membrana fosfatidilserina. Em estágios iniciais do processo de apoptose ocorre a translocação da fosfatidilserina do lado interno para o lado externo da membrana, o que possibilita a ligação da anexina V-FITC a este fosfolípido. Além disso, trabalhos relatam

que a anexina pode ligar-se à fosfatidilserina localizada no lado interno, desde que algum dano de membrana esteja presente, processo característico de estágios tardios do processo apoptótico ou do processo necrótico (KOOPMAN *et al.*, 1994; VERMES *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 2008).

Por sua vez, o PI, um derivado de fenantreno com atividade de intercalante inespecífico de DNA, é excluído pela membrana plasmática de células vivas e, conseqüentemente, retido por aquelas não viáveis (ZAMAI *et al.*, 1996; ERAY *et al.*, 2001). Portanto, para que haja marcação por este composto, é necessário que a integridade da membrana celular esteja comprometida. Assim, anexina e PI quando utilizados em conjunto permitem observar os diferentes estágios de morte celular.

Para estes ensaios, o ASA (ácido acetilsalicílico - 20 mM) foi utilizado como controle positivo de morte celular por apoptose (RAZA *et al.*, 2011). É possível observar na FIGURA 9, que após o tratamento com a maior concentração do SYD-1 (50 μ M – D-II) a fluorescência da anexina (verde) aumenta em relação ao controle (ausência de SYD-1 – B-II). No entanto, o mesmo efeito não foi observado após tratamento com a menor concentração do SYD-1 (25 μ M – C-II). Nenhuma marcação com PI foi visualizada após o tratamento com o SYD-1 em ambas as concentrações (25 e 50 μ M – C-III e D-III, respectivamente), uma vez que nenhuma fluorescência vermelha está aparente. Estes resultados sugerem que o composto induz a morte celular por apoptose somente na maior concentração, indicando certa seletividade para as células tumorais nesta condição. Isto motiva ainda mais o estudo da atividade antitumoral deste composto e dos possíveis mecanismos de ação envolvidos.

FIGURA 9: EFEITO DO SYD-1 NA INDUÇÃO DE MORTE CELULAR EM HEPATÓCITOS



FONTE: O autor (2016)

Nota: As condições experimentais estão descritas no item 5.6.6 da sessão de Materiais e Métodos. Os hepatócitos foram plaqueados (1×10^6 células por placa) em placas de 6 poços e deixadas para adesão em incubadora a 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 por 4 h. Posteriormente foi trocado o meio e realizado o tratamento com SYD-1 nas concentrações de 25 e 50 μM pelo tempo de 18 h. A seguir, o sobrenadante foi descartado, adicionou-se meio de ligação com anexina V-FITC e PI, seguindo-se incubação por 10 min. As imagens foram capturadas, conforme descrito no item 5.6.6 de materiais e métodos. As células positivas para anexina V-FITC estão coradas em verde (painel II) e as células positivas para PI estão coradas em vermelho (painel III). (A) controle positivo de morte por apoptose - células tratadas com ASA 20 mM; (B) controle - células tratadas com 0,01% de DMSO; (C) células tratadas com SYD-1 25 μM ; (D) células tratadas com SYD-1 50 μM . Painéis I - contraste de fase, II anexina V- FITC, III - PI. As imagens representam os resultados obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

6.2 Efeitos do SYD-1 em Linhagem de Hepatocarcinoma Humano (células HepG2)

6.2.1 Viabilidade

A viabilidade das células HepG2 após exposição ao SYD-1 por 24 h foi avaliada por quatro metodologias diferentes: redução do MTT, liberação da enzima LDH no meio de cultura e coloração com os corantes cristal violeta e azul de tripan.

O MTT é reduzido a formazan por desidrogenases de células viáveis. Através da medida colorimétrica do formazan, este método colorimétrico determina a viabilidade celular. A LDH, como descrito anteriormente, é uma enzima estritamente intracelular e quando presente no meio de cultura é indicativo de alteração de permeabilidade da membrana. O método por coloração com cristal violeta é simples e quantifica de maneira indireta a viabilidade celular. Se baseia na ligação deste corante a proteínas e DNA de células aderidas. As células não viáveis perdem a sua aderência, reduzindo assim a quantidade de corante na amostra (FEOKTISTOVA *et al.*, 2016). O azul de tripan, por sua vez, é impermeável a membrana celular, e quando presente no interior da célula é indicativo de alterações na integridade da membrana celular.

É importante ressaltar que a faixa de concentração do SYD-1 utilizada nestes ensaios, bem como o tempo de exposição, foram estabelecidos com base em trabalhos prévios (HALILA *et al.*, 2007; BRANDT, 2012; GOZZI *et al.*, 2013).

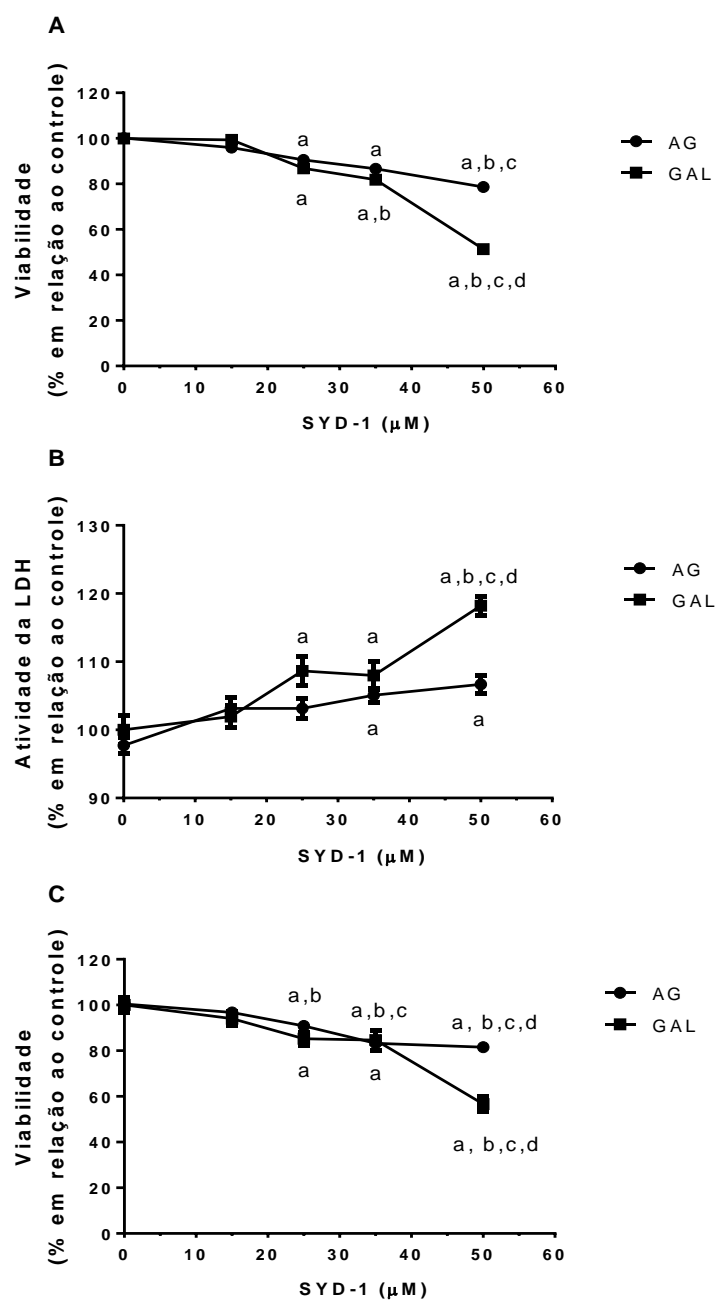
Os resultados estão apresentados na FIGURA 10 (A-C) e 11 (A-B). No ensaio do MTT observa-se uma diminuição da viabilidade das células HepG2 cultivadas em meio AG em ~10%, ~13% e ~22% para as concentrações 25, 35 e 50 μ M, respectivamente, em comparação ao controle. Quando o meio foi o GAL, o SYD-1 foi mais citotóxico, diminuindo a viabilidade em ~13%, ~18% e ~49%, respectivamente, para as mesmas concentrações (FIGURA 10A). No entanto, o composto (50 μ M) aumentou discretamente a

liberação de LDH em células crescidas em meio AG (~8%) e GAL (~18%), mantendo-se o efeito mais pronunciado para o meio contendo galactose/glutamina (FIGURA 10B). Este último resultado é mais compatível com o obtido pelo método de exclusão do azul de tripan, em que não se observou diferença estatística na viabilidade entre as células HepG2 mantidas em meio AG tratadas com SYD-1 (0-50 μ M) e o controle (FIGURA 11A). Porém, o SYD-1 inibiu a proliferação destas células em ~42% e ~45% na maior concentração (50 μ M), após 48 e 72 h de tratamento (FIGURA 11B).

Os resultados dos ensaios de viabilidade com cristal violeta foram semelhantes aos do MTT. O tratamento com o SYD-1 diminuiu a porcentagem de células HepG2 aderidas (mantidas em meio AG) em ~10%, ~17% e ~19% para as concentrações de 25, 35 and 50 μ M, respectivamente (FIGURA 10C). Enquanto que em meio GAL a redução correspondente foi de ~15%, ~16% e ~44%, respectivamente.

A literatura é controversa em relação ao melhor método de determinação da viabilidade celular. Forbes e colaboradores (2014) utilizaram linhagens de células de câncer de próstata (DU-145 e PC-3) e avaliaram a viabilidade destas células após tratamento com 11 diferentes compostos (flavonóides e seus análogos), com o objetivo de encontrar qual o melhor método para avaliar a citotoxicidade dos compostos. Os autores avaliaram os seguintes métodos: exclusão do azul de tripan e coloração com cristal violeta e Azul de Alamar (semelhante ao MTT). A partir dos resultados obtidos, os autores calcularam o EC_{50} para cada um dos compostos e os compararam entre si. Como resultado obtiveram que os flavonóides foram capazes de reduzir o Azul de Alamar mesmo na ausência de células, superestimando assim, o número de células tumorais viáveis. Estes compostos também interferiram com a metodologia do cristal violeta, enquanto que o azul de tripan foi o mais confiável dos 3 métodos, não sendo observado interferência dos compostos no resultado final (FORBES *et al.*, 2014).

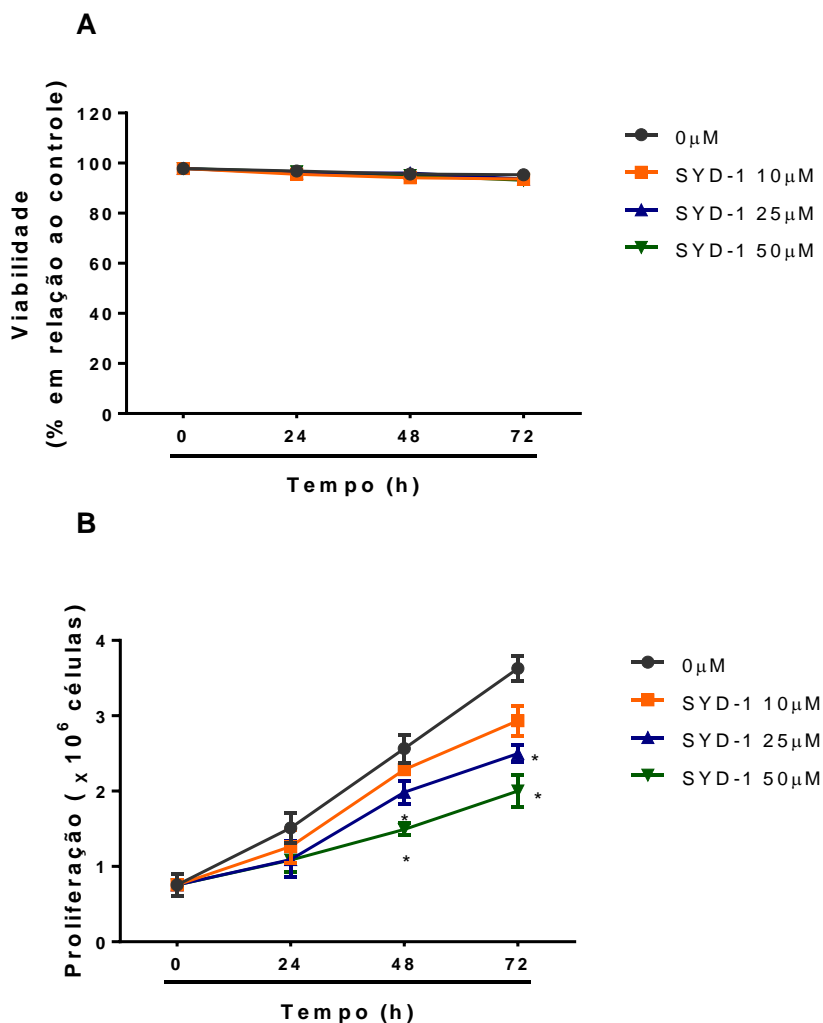
FIGURA 10: TOXICIDADE DO SYD-1 EM CÉLULAS HEPG2



FONTE: O autor (2016)

NOTA: As condições experimentais estão descritas no item 5.6.1 da sessão de Materiais e Métodos. **A-** MTT: As células HepG2 (1×10^4) foram plaqueadas em placa de 96 poços na presença ou ausência de SYD-1 (0-50 μM) por 24 h. Os valores representam a média \pm S.E.M de seis experimentos independentes realizados em triplicata. 100% corresponde a absorbância de $0,506 \pm 0,09$ e $0,38 \pm 0,07$ para os meios AG e GAL meio, respectivamente. **B-** LDH: A atividade da enzima LDH foi avaliada no sobrenadante das culturas de células HepG2 após o tratamento com SYD-1 (0-50 μM). Os resultados foram expressos como atividade em relação ao controle (média \pm S.E.M) de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. 100% corresponde a U/L de $0,09 \pm 0,007$ para o meio AG e $1,15 \pm 0,2$ para o meio GAL. **C-** Cristal violeta: Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (média \pm S.E.M) de três experimentos independentes realizados em triplicata. 100% corresponde a absorbância de $0,3 \pm 0,05$ and $0,81 \pm 0,1$, para os meios AG e GAL, respectivamente. ^aValores significativamente diferente do controle (DMSO 0,01%) em $p < 0,05$; ^bvalores significativamente diferente do SYD-1 15 μM em $p < 0,05$; ^cvalores significativamente diferente do SYD-1 25 μM em $p < 0,05$; ^dvalores significativamente diferente do SYD-1 35 μM em $p < 0,05$.

FIGURA 11: EFEITO DO SYD-1 SOBRE A VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS HEPG2



FONTE: O autor (2016)

NOTA: As condições experimentais estão descritas no item 5.6.1.4 da sessão de Materiais e Métodos. **A-** Viabilidade - r azul de tripan. **B-** Proliferação - azul de tripan. As células HepG2 ($0,3 \times 10^6$) foram plaqueadas em placa de 6 poços e cultivadas em meio AG na presença ou ausência de SYD-1 (0-50 μM) por 24-72 h. Após estes tempos, o sobrenadante e as células foram coletados, centrifugados e, foi adicionado azul de tripan. A contagem das células foi realizada em contador automático TC10. Os valores representam a média \pm S.E.M de três experimentos independentes realizados em triplicata *valores significativamente diferentes do controle (0 μM) em $p < 0,05$.

Outros autores também relataram diferenças nos resultados de viabilidade empregando metodologias distintas (CHIBA *et al.*, 1998; FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). É importante destacar que cada metodologia apresenta características próprias e limitações, por isso, é importante utilizar mais de um método. Além disso, é preciso levar em consideração a necessidade de usar estes ensaios como parte de uma série de análises,

considerando o conjunto final de dados de forma criteriosa para uma correta interpretação. Neste estudo, para tornar os resultados ainda mais fidedignos, os ensaios de viabilidade do MTT e da atividade LDH foram realizados em sistema livre de células em presença do composto, descartando-se qualquer interferência direta do SYD-1 na metodologia utilizada.

Assim, considerados em conjunto, os resultados dos ensaios de viabilidade demonstram que a toxicidade do SYD-1 sobre células HepG2 é concentração dependente e mais pronunciada quando o meio de cultura utilizado continha glutamina e galactose (meio GAL) em substituição a glucose, sugerindo o comprometimento da fosforilação oxidativa em presença do composto mesoiônico.

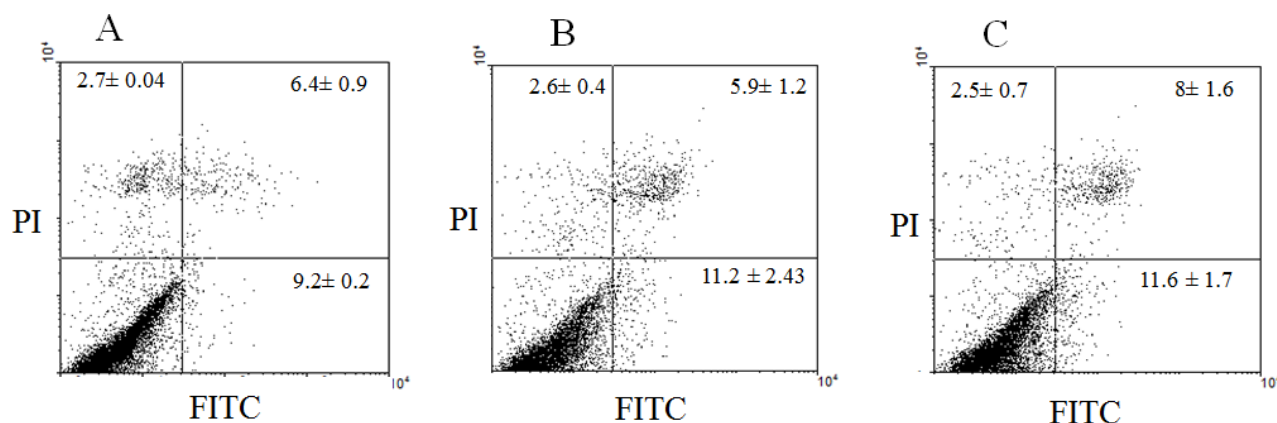
6.2.2 Morte celular

Considerando a toxicidade do SYD-1 sobre células HepG2, os possíveis mecanismos de morte celular induzidos pelo composto foram avaliados através de ensaios de dupla marcação com anexina V-FITC e PI, por citometria de fluxo. Como descrito anteriormente, a anexina apresenta grande afinidade pela fosfatidilserina, um fosfolípido de membrana exposto durante o processo de apoptose, enquanto o PI é um intercalante de DNA, permeável em células em processo de morte por necrose.

Conforme se observa na FIGURA 12, o tratamento com SYD-1 (25 e 50 μ M) aumentou discretamente o número de células marcadas com anexina (~2,5%) ou duplamente marcadas (~1,5%). Estes resultados não permitem concluir se a redução da viabilidade observada pelo método do MTT (FIGURA 10A) e a liberação de LDH (FIGURA 10B) estão relacionadas à morte celular. Deve-se considerar que o SYD-1 foi capaz de reduzir a proliferação das células HepG2 em meio AG (FIGURA 11B), o que poderia contribuir para os valores reduzidos dos ensaios de MTT. No entanto, o mesmo não se aplica aos ensaios de liberação de LDH. Assim, são necessários experimentos

complementares como, por exemplo, o de determinação das fases do ciclo celular em presença do mesoiônico, para esclarecer as causas da redução da viabilidade.

FIGURA 12: MARCAÇÃO DE CÉLULAS HEPG2 COM ANEXINA V-FITC E IODETO DE PROPÍDIO



FONTE: O autor (2016)

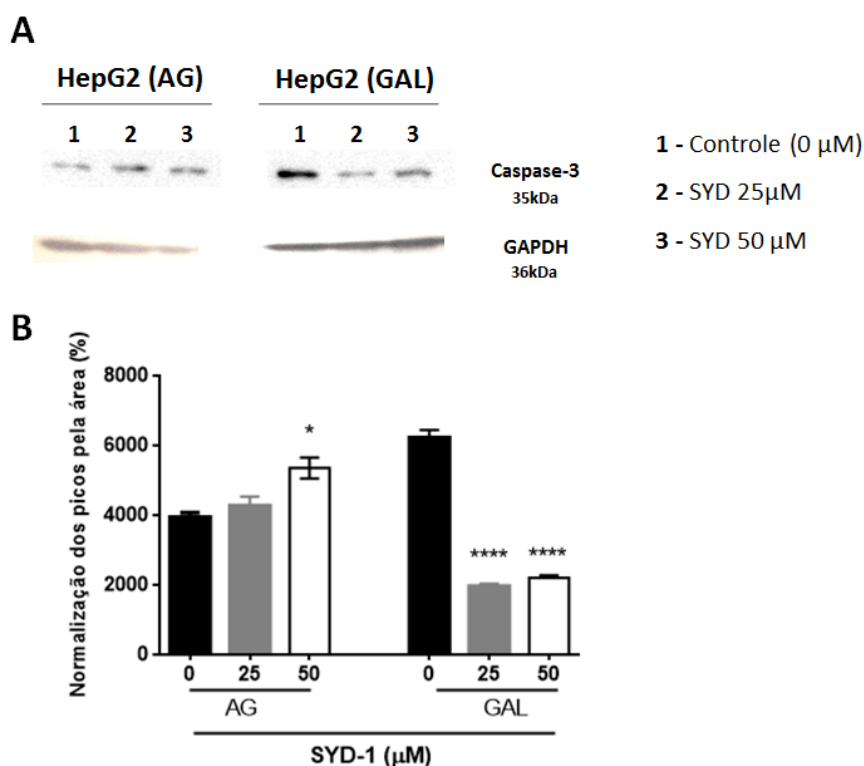
NOTA: As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos item 5.6.6. **A** - Controle; **B** - SYD-1 25 μM; **C** - SYD-1 50 μM. As células HepG2 (1×10^6 /mL) foram plaqueadas e tratadas com SYD-1 (25 e 50 μM) por 24 h. Após foram marcadas com anexina e PI e 10.000 eventos foram analisadas por citometria de fluxo. As figuras demonstram dot-plots representativos, sendo que cada quadrante representa uma população distinta dentro da mesma amostra: **quadrante esquerdo inferior** = células viáveis; **quadrante esquerdo superior** = células marcadas com PI; **quadrante direito inferior** = células marcadas com FITC; **quadrante direito superior** = células duplamente marcadas (FITC e PI). Os resultados foram expressos como média ± S.E.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata.

6.2.3 Expressão proteica

Considerando a discreta marcação com anexina e PI, e para investigar quais os processos envolvidos na redução de viabilidade induzido pelo SYD-1, foi avaliado por *Western Blotting* os níveis de conteúdo da proteína caspase-3. O resultado está apresentado na FIGURA 13 A-B. SYD-1 (50 μM) foi capaz de aumentar o conteúdo da proteína em células HepG2 mantidas em meio AG em ~36%, o que sugere ativação da via apoptótica. Isso porque, as caspases, proteínas pertencentes à família das cisteínas proteases, estão relacionadas diretamente com o desencadeamento desta via.

No entanto, o composto diminuiu significativamente a expressão da proteína caspase-3 nas células mantidas em meio GAL em ~65% para ambas concentrações utilizadas (25 e 50 μM).

FIGURA 13: EFEITO DO SYD-1 SOBRE OS NÍVEIS DE CASPASE 3 TOTAL E GAPDH



FONTE: O autor (2016)

NOTA: As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos item 5.6.9. As células HepG2 ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram plaqueadas e tratadas com SYD-1 (25 e 50 μM) por 24 h. Foram então processadas para análise por *Western Blotting* utilizando anticorpos específicos. **A** - Bandas da expressão da proteína caspase-3 total; GAPDH foi utilizado como controle de expressão protéica. **B** - Densitometria de bandas. Imagens representativas de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M. *,**** valores significativamente diferente do controle (0 μM) em $p < 0.05$ e $p < 0.0001$, respectivamente.

6.2.3 Respiração Celular

Com objetivo de avaliar os aspectos metabólicos envolvidos na significativa citotoxicidade do SYD-1 foram avaliados seus efeitos sobre a respiração das células

HepG2 aderidas e cultivadas nos meios AG ou GAL, bem como de células em suspensão em meio AG. O ensaio com células em suspensão foi realizado para avaliar os efeitos do composto após um curto período de exposição (2 min), também utilizado em estudos prévios com mitocôndrias isoladas (HALILA *et al.*, 2007; BRANDT, 2012). Vale lembrar que nessas condições de tratamento, o SYD-1 (25 e 50 μ M) não afetou a viabilidade das células HepG2, conforme determinado pelo método do azul de tripan (BRANDT, 2012).

Para os ensaios com as células aderidas, foram utilizadas células não permeabilizadas para manter as condições experimentais mais próximas das fisiológicas, além de possibilitar a determinação dos efeitos do SYD-1 decorrentes de sua interação com a membrana celular. Para isto, todos os reagentes utilizados eram permeáveis e como meio de reação utilizou-se o próprio meio de cultura (AG ou GAL).

A respiração celular foi determinada em quatro estados (HUTTER *et al.*, 2006), definidos a seguir:

- *Basal*: correspondente a respiração na ausência de substratos exógenos, de inibidores ou desacopladores;
- *Leak*: correspondente a respiração na ausência de substratos exógenos e na presença de oligomicina, um inibidor da ATPsintase (GNAIGER, 2009). Este estado reflete o transporte de elétrons que ocorre em resposta a entrada de prótons na matriz mitocondrial através da membrana mitocondrial interna, impulsionada pelo gradiente eletroquímico de prótons. Assim, o consumo de oxigênio durante este estado da respiração é maior em resposta ao aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna a prótons;
- *Desacoplado*: correspondente a respiração na ausência de substratos exógenos e em presença de oligomicina e do desacoplador FCCP. Caracterizado pelo consumo de oxigênio de forma independente da síntese de ATP, uma vez que o desacoplador promove

o livre movimento de prótons através da membrana mitocondrial interna e a velocidade máxima do transporte de elétrons (MONTEIRO *et al.*, 2011);

- *Inibido (Rotenona e Antimicina)*: corresponde a respiração na ausência de substratos exógenos e na presença de oligomicina, FCCP, rotenona e antimicina, sendo estes últimos inibidores do transporte de elétrons nos complexos I e III da cadeia respiratória, respectivamente.

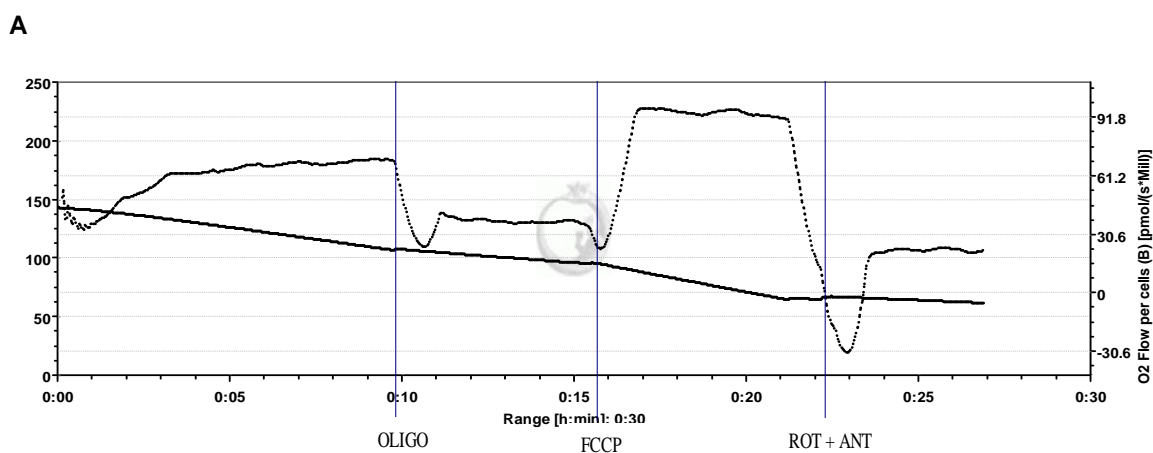
Para auxiliar na interpretação destes resultados, na FIGURA 14A está representado o traçado demonstrativo de um ensaio na ausência de SYD-1 (controle), onde estão representados a concentração de oxigênio (μM - linha contínua) e o fluxo de oxigênio ($[\text{pmols}/(\text{seg} \times 10^6 \text{ células})$ - linha pontilhada) durante os estados da respiração especificados acima. Observa-se, inicialmente, o consumo de oxigênio basal que, como esperado, foi significativamente diminuído com a adição de oligomicina. No entanto, embora em baixa velocidade, o consumo de oxigênio ainda ocorre em resposta à reentrada de prótons para matriz mitocondrial através da membrana (Estado *Leak*). A adição de FCCP promove o aumento do consumo de oxigênio, decorrente da tentativa da organela em restabelecer o gradiente eletroquímico de prótons (Estado desacoplado). Finalmente, a respiração mitocondrial é totalmente inibida pela adição de rotenona e antimicina (Estado inibido). Os resultados obtidos a partir destes traçados foram analisados pelo Software DataLab4[®] e os estados Basal, *Leak* e Desacoplado obtidos após a subtração da respiração verificada na presença de antimicina e rotenona (Estado inibido), são apresentados na forma de gráficos. Esta subtração é necessária para que se represente o consumo de oxigênio restrito à respiração mitocondrial (HUTTER *et al.*, 2006).

O tratamento com o SYD-1 por 24 h inibiu os estados respiratórios basal, *leak* e desacoplado de células HepG2 aderidas mantidas em meio AG em ~28%, ~32% e ~28% para a maior concentração (50 μM – FIGURA 14B). A inibição foi ainda mais pronunciada

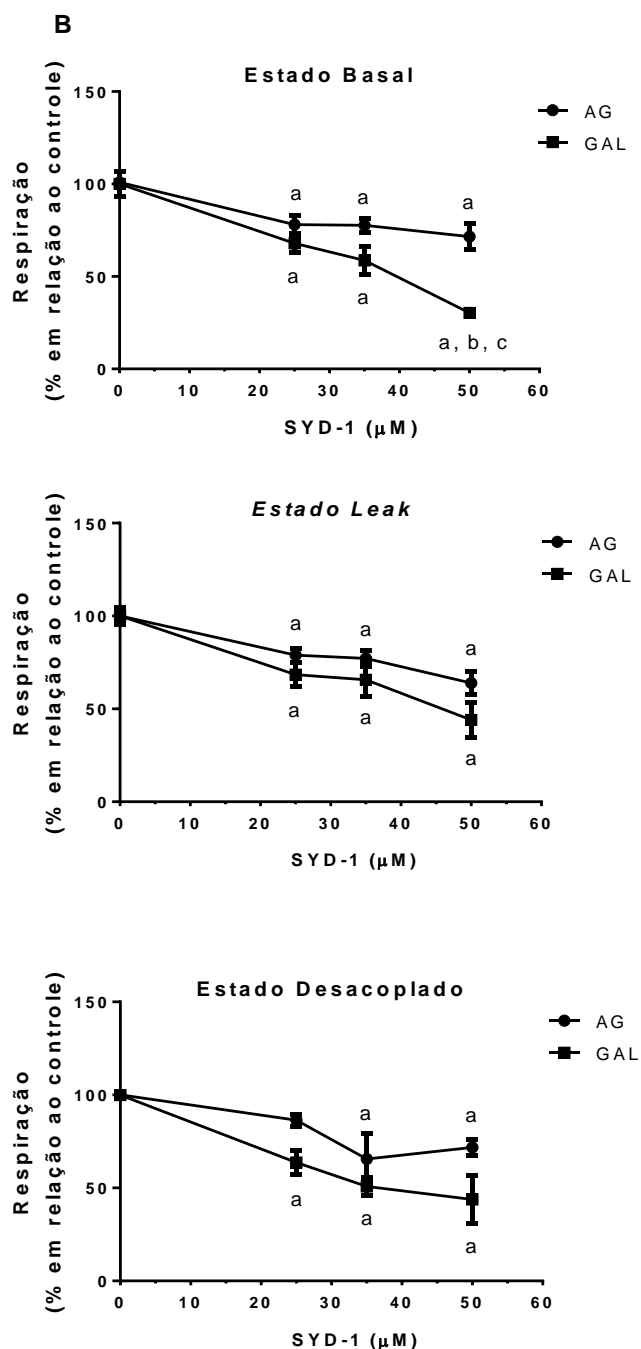
quando o meio de cultura utilizado foi o GAL, atingindo ~69% de inibição do estado basal e ~56% nos estados leak e desacoplado, após tratamento com a maior concentração do SYD-1 (50 μM – FIGURA 14B). No entanto, nenhum efeito foi observado nas células em suspensão mantidas em meio AG após o tratamento com SYD-1 (25 e 50 μM) por 2 min (FIGURA 15).

Os efeitos do SYD-1 sobre a respiração das células HepG2 (FIGURA 14) estão de acordo com a redução da viabilidade (FIGURA 10 e 11), e com os resultados de Halila e colaboradores (2007) em mitocôndrias isoladas, que evidenciaram a inibição do transporte de elétrons, como o efeito mais expressivo do SYD-1. Ainda, os resultados apresentados até o momento são relevantes uma vez que evidenciam que, na menor concentração (25 μM), a toxicidade do composto se restringe as células tumorais (HepG2), não causando qualquer efeito em hepatócitos não tumorais, conforme observado pela ausência de efeito do SYD-1 (25 μM) sobre os parâmetros de viabilidade (FIGURA 8), respiração, morfologia e os níveis de lactato e piruvato (BRANDT, 2012).

FIGURA 14: EFEITO DO SYD-1 SOBRE A RESPIRAÇÃO DE CÉLULAS HEPG2 ADERIDAS



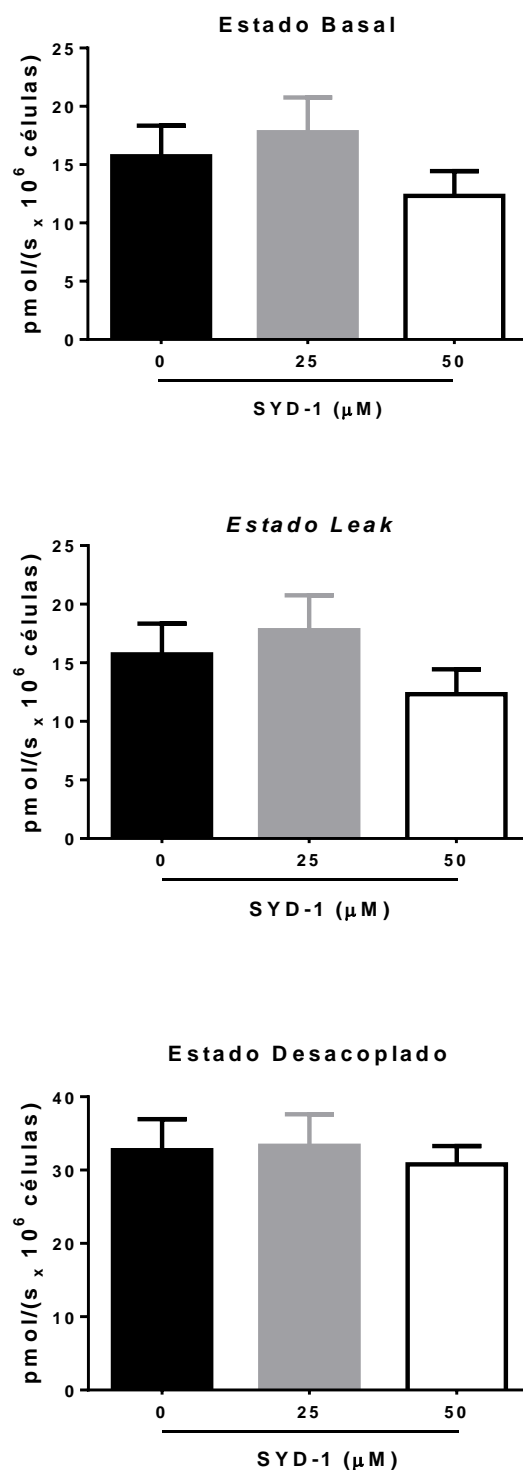
Continua na próxima página (número 71)



FONTE: O autor (2016)

NOTA: As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos no item 5.6.2. **A** - Traçado representativo da respiração de células HepG2 em Oxígrafo de alta resolução OROBOROS-2K: O sistema de reação foi o próprio meio de cultivo das células. Adições: Oligo- oligomicina; ROT – rotenona; ANT – antimicina. Linha contínua: concentração de O₂; Linha pontilhada – fluxo de O₂. **B** - Efeito do SYD-1 sobre a respiração de células HepG2 cultivadas: As células HepG2 (1×10⁶) foram plaqueadas, tratadas, coletadas e transferidas para as câmaras do oxígrafo Oroboros 2-K, onde o consumo de O₂ foi determinado na ausência de inibidores ou desacoplador (estado basal), na presença de oligomicina (estado leak) e na presença de FCCP (estado desacoplado). Os resultados foram expressos como pmolO₂/mg proteína, relativo ao controle (100%). Para o meio AG: 100%_{Basal} = 26,2±3,8; 100%_{Leak} = 6,91±1,9; 100%_{desacoplado} = 35,85±11,5. Para o meio GAL: 100%_{Basal} = 30,04±5,07; 100%_{Leak} = 7,07±1,9; 100%_{desacoplado} = 40,0±9,1. Os valores representam a média ± S.E.M. de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. ^avalores significativamente diferente do controle (DMSO 0,01%) em $p < 0,05$; ^bvalores significativamente diferente do SYD-1 25 μM em $p < 0,05$; ^cvalores significativamente diferente do SYD-1 35 μM em $p < 0,05$.

FIGURA 15: EFEITO DO SYD-1 SOBRE A RESPIRAÇÃO DE CÉLULAS HEPG2 EM SUSPENSÃO



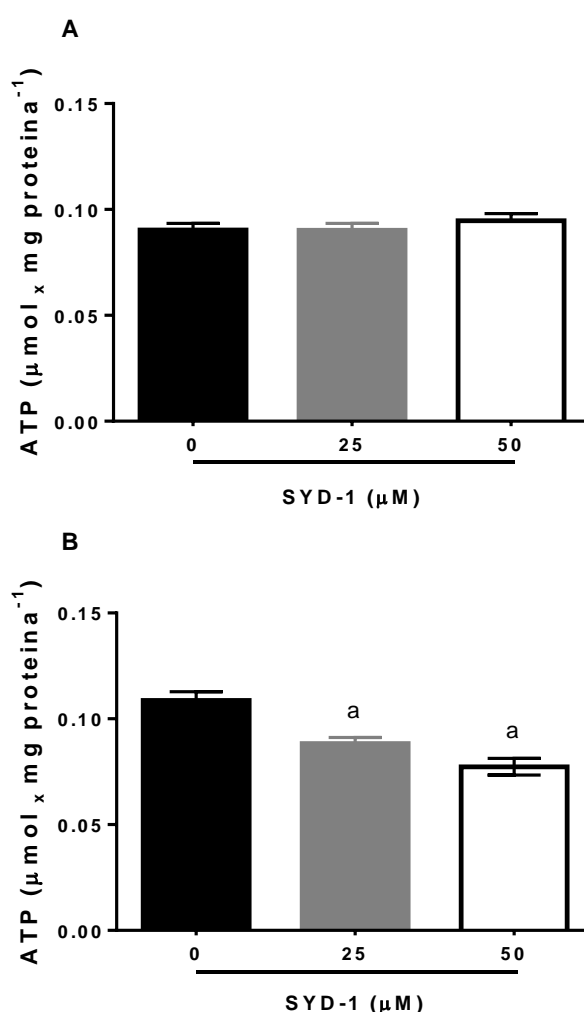
FONTE: O autor (2016)

NOTA: As condições experimentais estão descritas no item 5.6.2 da sessão de Materiais e Métodos. As células HepG2 em suspensão (1×10^6) foram transferidas para as câmaras do oxígrafo Oroboros 2-K, tratadas por 2 min e a respiração foi determinada na ausência de inibidores ou desacoplador (estado basal), na presença de oligomicina (estado leak) e na presença de FCCP (estado desacoplado). Os resultados representam a média \pm S.E.M de quatro experimentos independentes realizados em triplicata.

6.3.3 Níveis de ATP, Lactato e Piruvato

A expressiva inibição sobre a respiração das células HepG2 cultivadas em meio GAL, possivelmente é responsável pela redução dos níveis de ATP em ~19% e ~29%, para as concentrações de 25 e 50 μM do SYD-1, respectivamente (FIGURA 16B). Porém, nenhuma alteração nos níveis de ATP foi observada em células HepG2 cultivadas no meio AG e tratadas com SYD-1 (FIGURA 16A).

FIGURA 16: EFEITO DO SYD-1 SOBRE OS NÍVEIS DE ATP DE CÉLULAS HEPG2



FONTE: O autor (2016)

NOTA: As condições experimentais estão descritas no item 5.6.4 da sessão de Materiais e Métodos. **A** - células HepG2 cultivadas em meio AG. **B** - células HepG2 cultivadas em meio GAL. Células HepG2 (1×10^6) foram cultivadas e tratadas com SYD-1 (25 e 50 μM) por 24 h. Para mensurar os níveis de ATP foi usado um Kit e procedeu-se conforme instruções do fabricante. Os valores representam a média \pm S.E.M de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. ^avalores significativamente diferentes do controle (DMSO 0,01%) em $p < 0.05$.

Sabe-se que as células tumorais apresentam a via glicolítica anaeróbia estimulada mesmo em condições normais de provisão de oxigênio, alteração conhecida como efeito Warburg (WARBURG, 1956). Diante disto e considerando que SYD-1 inibiu a respiração celular (FIGURA 14), o que poderia desviar ainda mais o metabolismo para a oxidação parcial da glucose, foram determinados os níveis de lactato e piruvato em células HepG2 tratadas com o mesoiônico. Em meio rico em glucose (AG) foram avaliadas células em suspensão e aderidas, já em meio com galactose e glutamina (GAL), somente células aderidas.

Para os experimentos com as células HepG2 em suspensão, foram utilizadas as concentrações de 25 e 50 μM do SYD-1 e tempo de incubação prévio de 2 min. Após esse tempo, a reação foi iniciada com a adição de glucose e foram retiradas alíquotas nos tempos 1, 20 e 40 min para dosagem dos níveis de piruvato e lactato. O SYD-1 (25 μM) diminuiu os níveis de piruvato em ~16%, ~18% e ~25% para 1, 20 e 40 min (FIGURA 17A), respectivamente, enquanto os níveis de lactato não foram alterados (FIGURA 17B). Para a maior concentração do composto (50 μM), apesar da redução nos níveis de piruvato em ~32%, ~26% e ~38% para 1, 20 and 40 min, respectivamente, houve um aumento nos níveis de lactato somente após 20 e 40 min de incubação (~13% e ~17%, respectivamente).

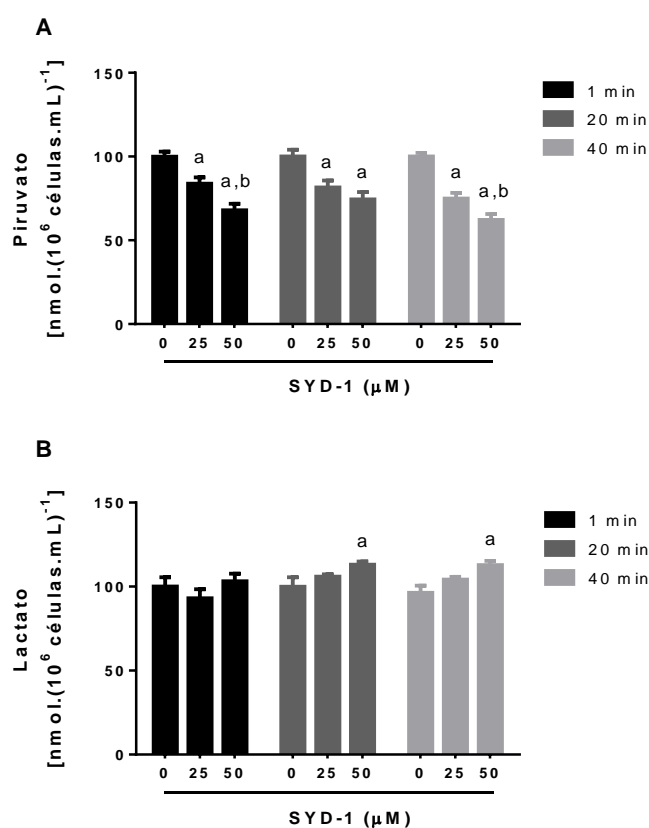
Resultado similar foi obtido para as células HepG2 aderidas em meio AG após tratamento por 24 h com SYD-1 25 μM (~17% de diminuição nos níveis de piruvato e ~13% de aumento nos níveis de lactato). Por sua vez, o tratamento com a maior concentração do SYD-1 (50 μM) foi mais efetivo, reduzindo os níveis de piruvato em ~52% e aumento dos níveis de lactato em ~25% (FIGURA 18A e B respectivamente).

Em concordância com os resultados de respiração (FIGURA 14), o efeito do SYD-1 foi mais pronunciado sobre as células HepG2 mantidas no meio GAL, atingindo níveis de redução de piruvato de ~29%, e ~59% para as concentrações de 25 e 50 μM ,

respectivamente (FIGURA 18A), enquanto que os níveis de lactato aumentaram em ~16% e ~32% para as mesmas concentrações (FIGURA 18B).

Estes resultados sugerem uma importante ativação da glicólise anaeróbia nestas células, particularmente quando cultivadas em meio GAL. Além disso, como nos ensaios anteriores, os resultados obtidos com as células cultivadas foram mais expressivos do que com as mesmas em suspensão. Isto pode ser decorrente do curto tempo de incubação com o composto, sendo de apenas 2 min nesta última condição.

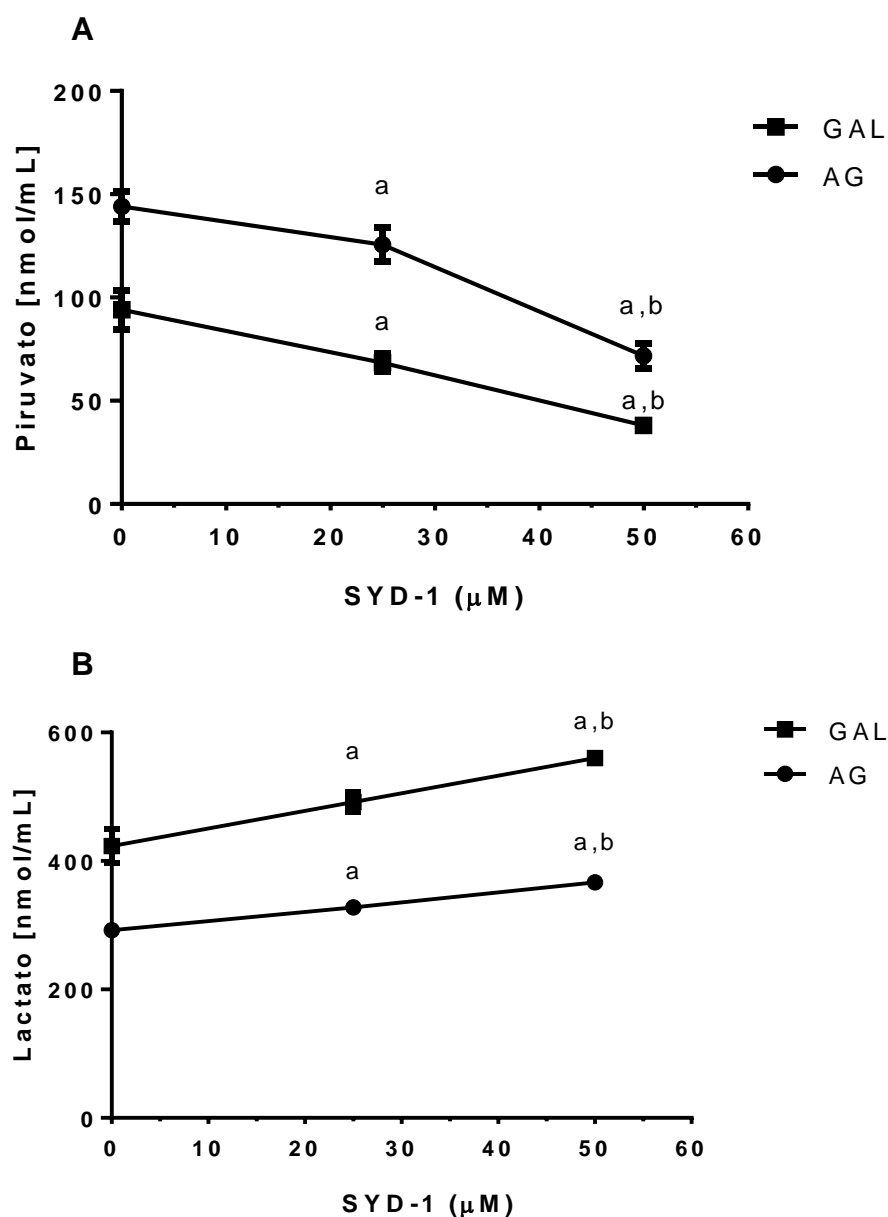
FIGURA 17: EFEITO DO SYD-1 SOBRE OS NÍVEIS DE PIRUVATO E LACTATO DE CÉLULAS HEPG2 EM SUSPENSÃO



FONTE: O autor (2016)

NOTA: As condições experimentais estão descritas no item 5.6.3 da sessão de Materiais e Métodos. **A** - Níveis de Piruvato; **B** - Níveis de Lactato. As células HepG2 (1×10^6 /mL) foram coletadas e mantidas em PBS a 37°C em constante agitação, tratadas com o SYD-1 (25 e 50 μM) por 2 min. A reação foi iniciada com a adição de 5 mM de glucose. Os níveis de piruvato e lactato foram mensurados no sobrenadante. O controle foi realizado na ausência de SYD-1 e presença de DMSO 0,01%. Para o piruvato, 100% corresponde: t1 = $27,75 \pm 2,03$; t20 = $25,48 \pm 2,51$; t40 = $27,71 \pm 1,59$. Para lactato, 100% corresponde: t1 = $63,75 \pm 10,56$; t20 = $65,95 \pm 10,31$; t40 = $75,70 \pm 11,23$. Os resultados são expressos como média \pm S.E.M. de quarto experimentos independentes realizados em triplicata. ^avalores significativamente diferente do controle (DMSO 0,01%) em $p < 0.05$; ^bvalores significativamente diferentes do SYD-1 25 μM em $p < 0.05$.

FIGURA 18: EFEITO DO SYD-1 SOBRE OS NÍVEIS DE PIRUVATO E LACTATO DE CÉLULAS HEPG2 ADERIDAS



FONTE: O autor (2016)

NOTA: As condições experimentais estão descritas no item 5.6.3 da sessão de Materiais e Métodos. **A** - Níveis de Piruvato; **B** - Níveis de Lactato. As células HepG2 ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram plaqueadas e tratadas com SYD-1 (25 e 50 μM) por 24 h. Os níveis de piruvato e lactato foram dosados no sobrenadante. Os resultados são expressos como média \pm S.E.M. de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. ^avalores significativamente diferente do controle (DMSO 0,01%) em $p < 0.05$; ^bvalores significativamente diferentes do SYD-1 25 μM em $p < 0.05$.

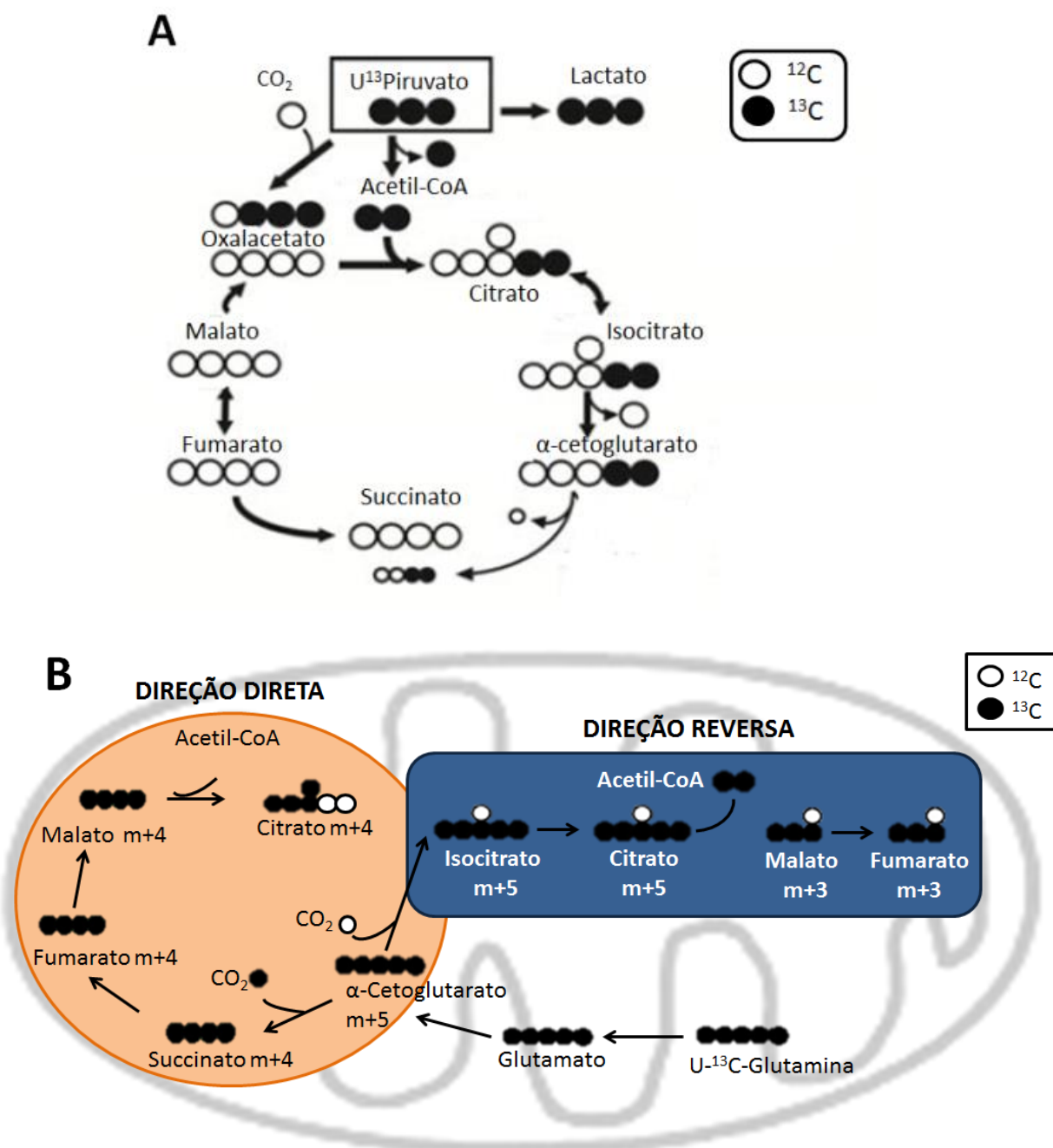
6.3.4 Metabolômica

Metabolômica pode ser definida como a medida do conjunto de metabólitos existentes em uma célula ou tecido, expostos a determinadas condições ambientais. Esta técnica é muito sensível e possibilita a análise simultânea de várias vias metabólicas (DEMINE *et al.*, 2014).

Na FIGURA 19 A-B está representado o fluxo de carbonos entre os metabólitos do ciclo de Krebs advindos da glucose (U- ^{13}C glucose – FIGURA 19A) ou da glutamina (U- ^{13}C glutamina – FIGURA 19B). Os carbonos marcados (^{13}C) são representados pelos círculos pretos e os não marcados (^{12}C) pelos círculos brancos, sendo que cada círculo representa um carbono. Os carbonos ^{13}C marcados provenientes da glucose são incorporados ao piruvato (3 carbonos marcados) via glicólise. Estes, por sua vez, podem ser incorporados ao oxalacetato (3 carbonos marcados), reação catalisada pela enzima piruvato carboxilase, ou ao citrato (2 carbonos marcados), após condensação do oxalacetato e acetil-CoA, reação esta catalisada pela enzima citrato sintase. Os carbonos seguem o ciclo, sendo transferidos para os metabólitos seguintes.

No entanto, os carbonos ^{13}C marcados provenientes da glutamina (5 carbonos marcados ou m+5) podem seguir duas vias, a direta (em laranja) e a reversa (em azul). Através da direta, os 5 carbonos marcados da glutamina são incorporados ao α -cetoglutarato que segue o ciclo na direção do succinato (4 carbonos ou m+4), reação catalisada pela succinil CoA-sintetase. Já pela via inversa, os carbonos incorporados ao α -cetoglutarato seguem na direção do isocitrato (5 carbonos ou m+5), reação catalisada pela enzima isocitrato desidrogenase isoforma 1.

FIGURA 19: REPRESENTAÇÃO DO FLUXO DE CARBONOS



FONTE: O autor (2016)

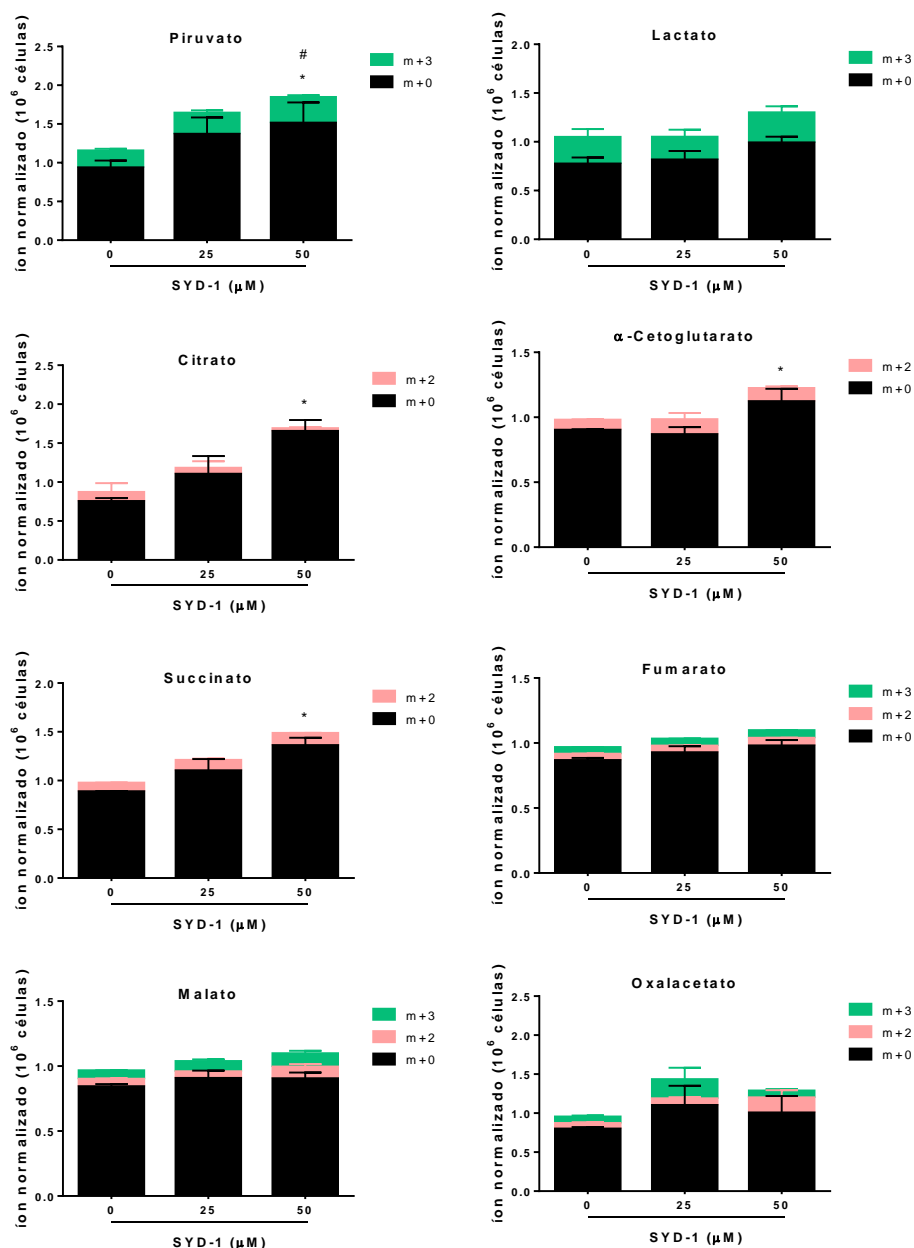
NOTA: As condições experimentais estão descritas no item 5.6.8 da sessão de Materiais e Métodos. **A** – Representação do fluxo de carbono através de experimentos de metabolômica usando $[U^{13}C]$ -glucose. Círculo branco representa ^{12}C endógeno ou não marcado ($m+0$), e círculo preto representa ^{13}C enriquecimento ($m+2$ e $m+3$); **B** – Representação do fluxo de carbono através de experimentos de metabolômica usando $[U^{13}C]$ -glutamina para avaliar as duas direções do ciclo de Krebs: a via direta (laranja) e a reversa (azul). Círculo branco representa ^{12}C endógeno e não marcado ($m+0$), e círculo preto representa ^{13}C enriquecimento com carbono marcado ($m+4$ - direção direta-, e $m+3$ - direção reversa).

Fazendo uso desta metodologia, neste estudo utilizou-se U- ^{13}C glucose (FIGURA 20) e U- ^{13}C glutamina (FIGURA 21) para avaliar os efeitos do tratamento com SYD-1 (24 h), sobre metabólitos do ciclo de krebs de células HepG2 cultivadas em meio AG. Observa-se na FIGURA 20, que o composto foi capaz de aumentar a quantidade dos metabólitos piruvato (~62%), citrato (~76%), α -cetoglutarato (~11%) e succinato (~13%), conforme observado pelo aumento em m+0 (representa ^{12}C endógeno ou não enriquecido com carbono marcado ^{13}C). No entanto, somente é observado enriquecimento do piruvato (~36%) com ^{13}C , como observado pelo aumento em m+2 (representa incorporação de dois carbonos ^{13}C marcados ao metabólito). Isso pode ser decorrente de uma inibição de enzimas do ciclo de Krebs, sugerindo uma maior atividade da via glicolítica. De fato, as células HepG2 tratadas com SYD-1 parecem ter a via glicolítica ativada, particularmente aquelas cultivadas em condições de desvio metabólico (meio GAL - FIGURA 18). Vale lembrar que esta possível ativação da via glicolítica pode ocorrer em resposta a inibição do SYD-1 sobre a cadeia respiratória (HALILA et al., 2007), o que promoveria um aumento dos níveis de NADH, um importante modulador alostérico negativo do ciclo de Krebs. Ainda, a inibição da cadeia respiratória poderia justificar o aumento dos níveis de succinato (FIGURA 20). Por fim, o citrato acumulado poderia ser desviado para a produção de ácidos graxos, considerando a importante redução nos níveis de enriquecimento com carbono marcado do α -cetoglutarato em relação ao citrato.

Por outro lado, quando utilizado [U- ^{13}C]-glutamina é possível observar que todos os metabólitos foram enriquecidos com o isótopo após tratamento com SYD-1 (FIGURA 21), conforme observado pelos aumentos em m+3 m+4 e m+5, que representam incorporação de três, quatro e cinco carbonos ^{13}C marcados aos metabólitos, respectivamente. Isso sugere que o SYD-1, ao interferir no ciclo de Krebs, regule

indiretamente o metabolismo da glutamina e, ainda, que a glutamina é um importante substrato para estas células.

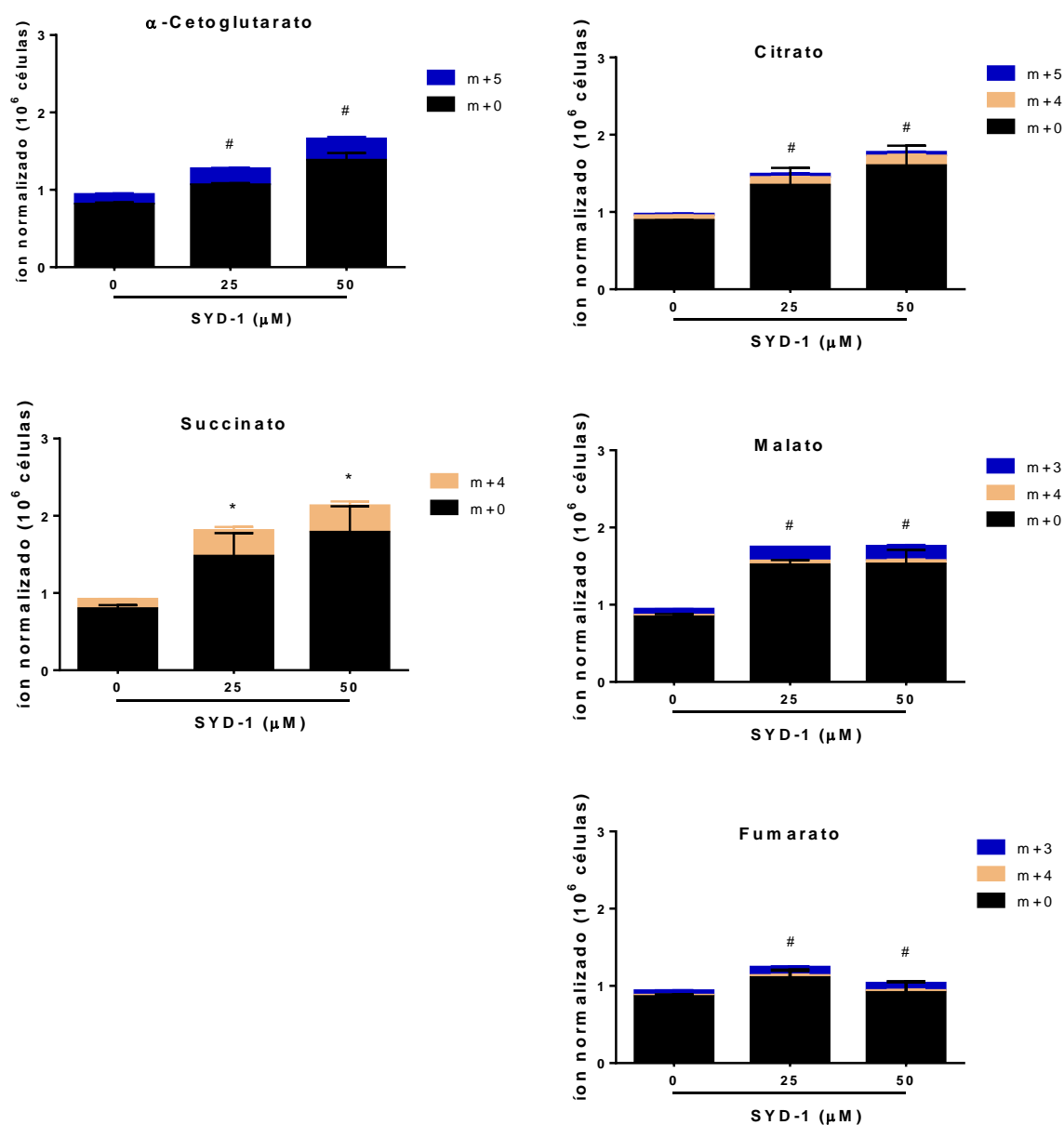
FIGURA 20: EFEITO DO SYD-1 SOBRE OS METABÓLITOS DO CICLO DE KREBS - U- C^{13} GLUCOSE



FONTE: O autor (2016)

NOTA: As condições experimentais estão descritas no item 5.6.8 da sessão de Materiais e Métodos. As células HepG2 (1×10^6 /mL) foram plaqueadas e tratadas com SYD-1 (25 e 50 μM) por 24 h. Enriquecimento com isótopo de carbono foi avaliado após 45 min de exposição. Os resultados são expressos como média ± S.E.M. de seis experimentos independentes realizados em triplicata. * valores significativamente diferentes do controle (DMSO 0,01%) para m+0 em $p < 0.05$; # valores significativamente diferentes do controle (DMSO 0,01%) para m+3 em $p < 0.05$.

FIGURA 21: EFEITO DO SYD-1 SOBRE OS METABÓLITOS DO CICLO DE KREBS - U-C¹³GLUTAMINA



FONTE: O autor (2016)

NOTA: As condições experimentais estão descritas no item 5.6.8 da sessão de Materiais e Métodos. As células HepG2 (1×10⁶/mL) foram plaqueadas e tratadas com SYD-1 (25 e 50 μM) por 24 h. Enriquecimento com isótopo de carbono foi avaliado após 45 min de exposição. Os resultados são expressos como média ± S.E.M. de seis experimentos independentes realizados em triplicata. * valores significativamente diferentes do controle (DMSO 0,01%) para m+4 em $p < 0.05$; # valores significativamente diferentes do controle (DMSO 0,01%) para m+5 em $p < 0.05$.

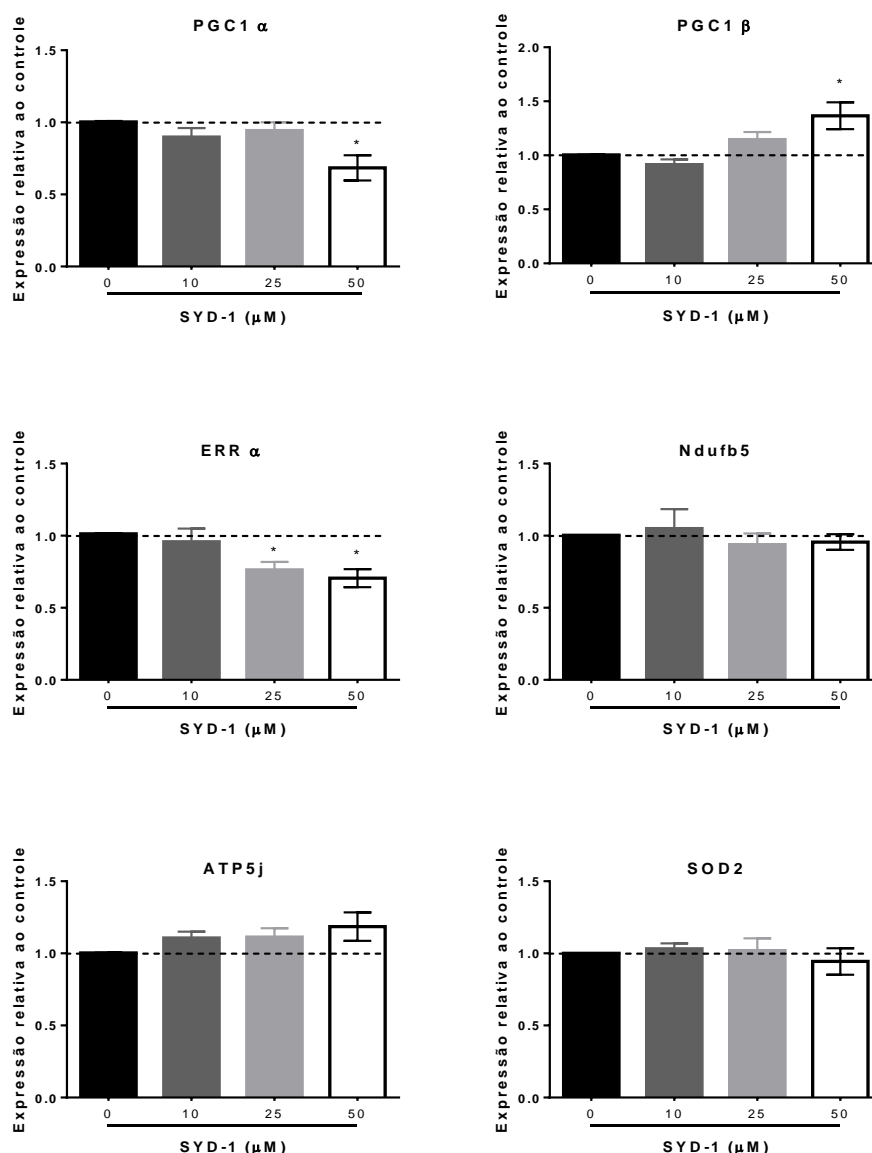
6.3.5 Níveis de mRNA (PGC1 e seus alvos; enzimas antioxidantes)

Considerando a importância da família de coativadores transcricionais PGC1 na regulação de diversas via metabólicas, particularmente da biogênese mitocondrial e, dos importantes efeitos causados pelo SYD-1 sobre a bioenergética mitocondrial, na próxima etapa deste estudo foi mensurada a expressão dos principais genes representantes desta família (PGC1 α e PGC1 β), bem como dos seus alvos downstream - ERR α , ATP5j, Ndufb5 e SOD2 -, após tratamento das células HepG2 (crescidas em meio AG), com SYD-1 (0-50 μ M) por 24 h.

O ERR α é um receptor nuclear que uma vez ativado por PGC1 α pode induzir a expressão de genes relacionados à diferentes vias metabólicas, como fosforilação oxidativa, ciclo de Krebs, beta oxidação dos ácidos graxos, entre outras (RANHOTRA, 2015). O ATP5j codifica para a subunidade F6 do complexo Fo da ATP sintase, a proteína mitocondrial responsável pela síntese e liberação de ATP (ZHU *et al.*, 2013). Ndufb5 codifica uma proteína componente da NADH:ubiquinona oxidoreductase (complexo 1) (TON *et al.*, 1997). Finalmente, o gene SOD2 é um membro da família ferro/mangânês superóxido dismutase que codifica para a enzima mitocondrial Manganês Superóxido Dismutase (MnSOD), que catalisa a dismutação do ânion superóxido à peróxido de hidrogênio (ZELKO *et al.*, 2002).

Como resultados, na FIGURA 22 observamos a redução da expressão de PGC1 α e seu alvo *downstream* ERR α em ~30%, com aparente aumento compensatório na expressão de PGC1 β (~36%), após tratamento com a maior concentração do SYD-1 (50 μ M), por 24h. Essa redução de ERR α pode estar relacionada a inibição de ~28% nos estados respiratórios das células HepG2 mantidas em meio AG, na mesma concentração de SYD-1 e tempo de tratamento (FIGURA 14B).

FIGURA 22: EFEITO DO SYD-1 SOBRE A EXPRESSÃO DE PGC1 α E SEUS ALVOS APÓS 24 H DE TRATAMENTO



FONTE: O autor (2016)

NOTA: A metodologia está descrita em Materiais e Métodos item 5.6.7. As células HepG2 foram crescidas até ~70% de confluência e tratadas com SYD-1 (10-50 μM) por 24 h. Após, o mRNA foi coletado, sintetizado o cDNA e a expressão mensurada utilizando primer específicos para cada gene. Os resultados foram normalizados em relação a proteína Tpb e estão expressos como média \pm S.E.M. de sete experimentos independentes realizados em triplicata. *valores significativamente diferentes do controle (DMSO 0,01%) em $p < 0.05$.

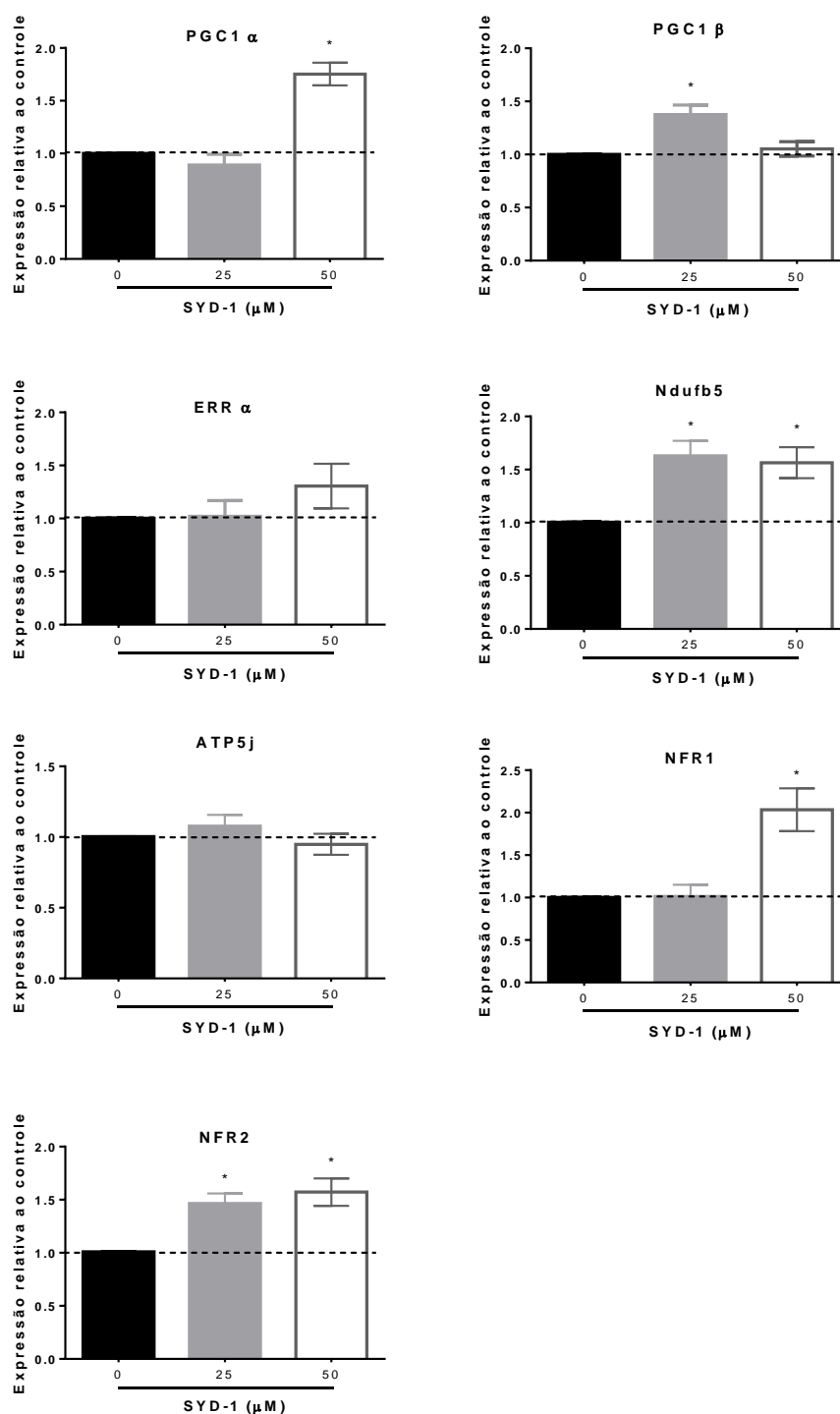
Após 72 h de tratamento com o SYD-1 (50 μM) (FIGURA 23), os efeitos foram mais pronunciados, havendo um aumento na expressão de PGC1 α (~75%), NFR1 (~103%), NFR2 (~56%) e Ndufb5 (~56%). Também em menor concentração (25 μM),

observou-se um expressivo aumento na expressão de PGC1 β (~32%), NFR2 (~45%) e Ndufb5 (~62%).

NFR1 e NFR2 (fatores respiratórios nucleares) promovem a ativação de genes nucleares que são codificantes das subunidades dos complexos que compõem a cadeia respiratória, uma vez que a capacidade codificante do mtDNA é limitada (SCARPULLA, 1997). Assim, os resultados demonstram que o tratamento com o SYD-1 por 72 h é capaz de promover o aumento de expressão de PGC1 α , que por sua vez induz a expressão de seus ligantes NFR1 e NFR2, e consequentemente de subunidades da cadeia respiratória como Ndufb5. Estes resultados podem representar uma tentativa de recuperação celular frente ao expressivo efeito do composto mesoiônico sobre o metabolismo energético, observado em 24h de tratamento.

A mitocôndria é a maior fonte de ROS, que podem atuar tanto como moléculas sinalizadoras quanto citotóxicas, dependendo de sua concentração intracelular (CAITO; ASCHNER, 2015). Disfunções mitocondriais podem resultar em altos níveis de ROS, estresse oxidativo e dano celular. Assim, para que as células mantenham sua homeostase, os níveis de ROS devem ser controlados pelo sistemas antioxidantes não-enzimático e enzimático, representados por proteínas como a glutathione e enzimas como a SOD, catalase, glutathione peroxidase, entre outras, respectivamente (VALKO *et al.*, 2006). Considerando a significativa inibição do SYD-1 sobre a respiração mitocondrial - o que poderia levar a um aumento na produção de ROS -, foram avaliados também seus efeitos sobre a expressão gênica de algumas proteínas relacionadas as defesas antioxidantes celulares.

FIGURA 23: EFEITO DO SYD-1 SOBRE A EXPRESSÃO DE PGC1 α E SEUS ALVOS APÓS 72 H DE TRATAMENTO



FONTE: O autor (2016)

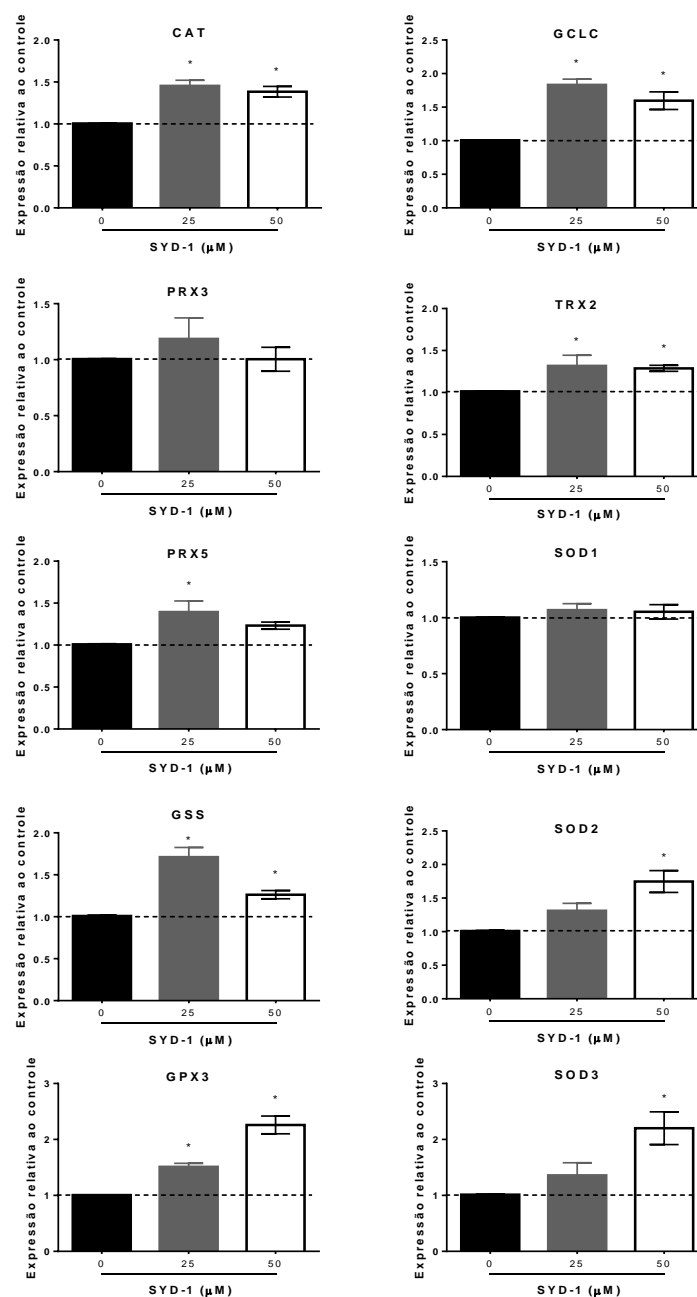
NOTA: A metodologia está descrita em Materiais e Métodos item 5.6.7. As células HepG2 foram crescidas até ~70% de confluência e tratadas com SYD-1 (10-50 μM) por 24 h. Após, o mRNA foi coletado, sintetizado o cDNA e a expressão mensurada utilizando primer específicos para cada gene. Os resultados foram normalizados em relação a proteína Tpb e estão expressos como média \pm S.E.M. de sete experimentos independentes realizados em triplicata. * valores significativamente diferentes do controle (DMSO 0,01%) em $p < 0.05$.

Após 72 h de tratamento das células HepG2 (mantidas em meio AG) com o SYD-1, observou-se elevada expressão de vários genes relacionados com a defesa antioxidante celular, conforme mostrado na FIGURA 24. SYD-1 promoveu um aumento da expressão do gene CAT - codifica para a enzima antioxidante catalase -, em ~44% (25 μ M) e ~38% (50 μ M). Somente a menor concentração do SYD-1 (25 μ M) foi capaz de aumentar em ~38% a expressão de PRX5, que pertence juntamente com PRX3, da superfamília das peroxiredoxinas e catalisam a redução de hidroperóxidos (BARELIER *et al.*, 2010). GCLC - gene da primeira enzima limitante na síntese da glutathione -, teve sua expressão aumentada em ~82% e ~59% para as concentrações 25 e 50 μ M, respectivamente, enquanto o gene GSS - glutathione sintetase - que catalisa a segunda etapa na biossíntese da glutathione-, aumentou em ~69% e ~25% para as mesmas concentrações. GPX3 - glutathione peroxidase 3, responsável pela detoxificação do H_2O_2 -, foi ainda mais estimulado, chegando a ~124% para a maior concentração. TRX2, forma mitocondrial da tioredoxina - importante na regulação do potencial de membrana mitocondrial e proteção contra apoptose induzida por oxidantes-, (MIN *et al.*, 2010), também foi aumentado em ~30% para as duas concentrações (25 e 50 μ M). SOD ou superóxido dismutase 1 (citoplasmática), 2 (mitocondrial) e 3 (extracelular), são responsáveis pela dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio e, embora a expressão de SOD1 não tenha sido alterada após tratamento com o composto, a expressão de SOD2 e SOD3 aumentaram em ~73% e ~117% para a maior concentração (50 μ M).

Este aumento da atividade antioxidante pode ocorrer como resposta a um possível aumento na produção de ROS, devido a disfunção mitocondrial após exposição das células ao mesoiônico (FIGURA 14). Neste sentido, Gozzi e colaboradores (2013) avaliaram parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, e evidenciaram que o composto SYD-1 inibiu as enzimas glutathione peroxidase e redutase, aumentou a captação de cálcio, inibiu a

lipoperoxidação ferro-induzida e foi capaz de sequestrar radicais superóxido (GOZZI *et al.*, 2013).

FIGURA 24: EFEITO DO SYD-1 SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM O ESTRESSE OXIDATIVO



FONTE: O autor (2016)

NOTA: A metodologia está descrita em Materiais e Métodos item 5.6.7. As células HepG2 foram crescidas até ~70% de confluência e tratadas com SYD-1 (10-50 μM) por 24 h. Após, o mRNA foi coletado, sintetizado o cDNA e a expressão mensurada utilizando primer específicos para cada gene. Os resultados foram normalizados em relação a proteína Tpb e estão expressos como média ± S.E.M. de sete experimentos independentes realizados em triplicata. * valores significativamente diferentes do controle (DMSO 0,01%) em $p < 0.05$.

6.3.7 Resistência a múltiplas drogas (MDR)

A capacidade do SYD-1 de ser transportado e/ou de inibir o transporte de medicamentos que são substratos dos transportadores Pgp, ABCG2 e MRP1, foi avaliada. O acúmulo de substratos fluorescentes em células que superexpressam transportadores ABC incubadas com SYD-1 (25 μ M por 30 min) ou com inibidores de referência (usados como controles) foi determinada por citometria de fluxo. A TABELA 2 demonstra que SYD-1 inibiu em ~ 64% o efluxo de mitoxantrona mediado por ABCG2, em comparação com o controle, em que o efluxo foi totalmente inibido por 1 μ M Ko143. No entanto, o transporte de Rodamina 123 e calceína-AM mediado por PGP e MRP1 foi apenas fracamente inibido (~12%) ou inalterado (~3%), pelo composto, respectivamente. A capacidade da sidnona de ser transportada foi avaliada pela relação entre as resistências (RR), que foi obtida dividindo-se os valores de IG_{50} estimados a partir de ensaios de viabilidade (MTT) para as células transfectadas que superexpressam o transportador de múltiplas drogas com os valores correspondentes para as suas linhas parentais, linhagens sensíveis. Valores >1 sugerem efluxo mediado por transportador (HALL *et al.*, 2009). Assim, os dados sugerem que SYD-1 não pode ser transportado, uma vez que os valores de RR foram próximos do valor 1 (TABELA 2).

TABELA 2: EFEITO DO SYD-1 SOBRE ATIVIDADE MDR DE TRANSPORTE CELULAR

	% inibição (SYD-1 25 μ M)	^a IG ₅₀ (μ M) transfectadas	^b IG ₅₀ (μ M) controle	RR
Pgp	2,5 \pm 1,8	25,6 \pm 0,3	23,5 \pm 2,1	1,08
ABCG2	64,3 \pm 25,7	31 \pm 2,0	37,9 \pm 3,8	0,82
MRP1	11,7 \pm 0,6	39,4 \pm 4,7	33,7 \pm 1,1	1,17

FONTE: o autor

Nota: As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos item 4.6.5. A eficiência do SYD-1 em inibir o efluxo de substratos fluorescentes foi determinada por citometria de fluxo, relativamente aos controles (célula parental ou transfectadas totalmente inibida com os inibidores de referência). Os valores IG₅₀ (μ M) foram obtidos através de ensaios de MTT após tratamento com SYD-1 0-100 μ M durante 72 h; foram calculados como concentração do SYD-1 que produz metade da inibição máxima de crescimento. ^aIG₅₀ foi obtido com células resistentes transfectadas; ^bIG₅₀ foi obtido com células controle sensíveis; RR: relação entre as resistências.

7. DISCUSSÃO FINAL

Para derivados de compostos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazóis foram demonstrados significativos efeitos antitumoral contra melanoma murino e citotóxico em células HepG2 e em diferentes linhagens de melanoma humano (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2003; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004; GOZZI *et al.*, 2015). Esses efeitos também foram descritos para algumas sidnonas, mas os mecanismos envolvidos não foram avaliados. O presente estudo além de avaliar a ação seletiva do SYD-1 para células de hepatocarcinoma (HepG2) em relação a hepatócitos não tumorais, investigou parâmetros do metabolismo energético mitocondrial e celular, na tentativa de delinear um possível mecanismo de ação do composto.

Sabe-se que as células tumorais obtêm grande parte de sua energia (ATP) através da via glicolítica, fenômeno conhecido como glicólise aeróbia ou Efeito Warburg (WARBURG, 1956). Assim, esta via é expressivamente estimulada nessas células,

resultando em elevada produção de lactato e acidificação do meio circulante. Diferentemente das células não tumorais, que não conseguem sobreviver em tais condições, células cancerosas utilizam esta característica para melhorar a sua capacidade de invasão (ROSSIGNOL *et al.*, 2004), como por exemplo, através da indução da produção de metaloproteinases de matriz (MMP-9) ou ativação da via fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (ROMERO-GARCIA *et al.*, 2016).

De posse destas informações e considerando que o SYD-1 reduziu a eficiência da fosforilação oxidativa em mitocôndrias isoladas (HALILA *et al.*, 2007), neste estudo buscou-se determinar a real contribuição deste efeito na ação citotóxica e antitumoral do mesoiônico. Para isso, foram utilizados dois meios de cultura, objetivando induzir o desvio metabólico nestas células para a fosforilação oxidativa (meio GAL), ou via glicolítica (meio AG). Observou-se que a ação do composto foi mais pronunciada quando as células HepG2 foram cultivadas nas condições do meio GAL, particularmente na concentração mais elevada (50 μ M), sugerindo que os efeitos descritos por Halila e colaboradores (2007) são importantes para a atividade tóxica do SYD-1 em células HepG2. O mesoiônico reduziu expressivamente a viabilidade celular (FIGURA 11), avaliada pelos métodos do MTT e cristal violeta, que se baseiam na atividade metabólica e ligação ao DNA, respectivamente. É importante destacar ainda, que utilizando o método do MTT, SYD-1 em baixa concentração (25 μ M), reduziu a viabilidade de forma mais significativa nas células tumorais (HepG2) em relação as células não tumorais (hepatócitos), sugerindo seletividade do composto naquela concentração (BRANDT, 2012). Porém, quando este parâmetro foi avaliado pelo método de exclusão do azul de tripan e atividade da LDH no meio de cultura, os efeitos foram discretos. Estes resultados chamam atenção na medida em que nesses dois métodos é fundamental a manutenção das propriedades da membrana celular, sugerindo que o SYD-1 não afeta a sua integridade. Por outro lado, Halila e

colaboradores (2007) observaram que o SYD-1 reduz o swelling de mitocôndrias isoladas de fígado de rato, além de afetar a contração da organela, sugerindo que o composto possa interagir com a membrana mitocondrial (HALILA *et al.*, 2007). Ainda neste sentido, Pires e colaboradores (2011) demonstraram que alguns compostos mesoiônicos (derivados 1,3,4-tiadiazóis) são capazes de se inserir na bicamada lipídica, gerando modificações físicas no ambiente hidrofóbico que resultam na diminuição da sua fluidez (PIRES ADO *et al.*, 2011). Assim, para que os efeitos do SYD-1 sobre a permeabilidade de membrana sejam esclarecidos, são necessários estudos específicos, como os de polarização de fluorescência com as sondas DPH e DPH-PA que monitoram as regiões polares e apolares de membranas lipídicas, respectivamente (LENTZ *et al.*, 1976; TROTTER; STORCH, 1989). Outro ponto a considerar é a diferença entre a composição das membranas plasmática e mitocondriais. Enquanto, a membrana plasmática é composta por 40% de lipídeos e 60% de proteínas, a membrana mitocondrial interna possui 75% de proteínas e 25% de lipídeos (NICHOLLS, 2013). Assim, é provável que o SYD-1 interaja de maneiras diferentes com estas membranas.

Embora nenhuma diferença tenha sido observada na capacidade respiratória máxima e no turnover de ATP, a toxicidade do SYD-1 em células HepG2 foi confirmada pela significativa inibição de todos os estados da respiração celular, sendo mais expressiva em células HepG2 cultivadas em meio GAL,. Nesse sentido, Halila e colaboradores (2007) demonstraram que este composto inibe a glutamato desidrogenase em mitocôndrias isoladas. Esta enzima catalisa a desaminação oxidativa do glutamato a α -cetoglutarato, intermediário do Ciclo de Krebs, com a redução de NAD^+ a NADH. Assim, embora devam ser consideradas as diferenças entre as condições e modelos experimentais, é possível que este efeito também contribua para a inibição da respiração em células HepG2, uma vez que esta é a principal via pela qual as células cultivadas em meio GAL obtêm energia.

Somando-se a isso, o SYD-1 parece regular o metabolismo da glutamina através da modulação de reações do ciclo de Krebs conforme demonstrado pelas análises de metabolômica (FIGURA 21). Isso porque observa-se um aumento na incorporação de carbono marcado proveniente da glutamina nos metabólitos α -cetoglutarato e succinato, mas não no fumarato, sugerindo acúmulo de succinato pelo bloqueio do ciclo nessa etapa, ou devido a inibição da cadeia respiratória anteriormente descrita para o SYD-1 (Halila et al., 2007). Por outro lado, é observado um aumento de incorporação de carbono marcado no citrato, malato e fumarato, sugerindo uma maior utilização da via redutiva reversa do α -cetoglutarato (FIGURA 21). Esta via não convencional de produção de intermediários do ciclo de Krebs ocorre em resposta a comprometimentos no metabolismo oxidativo, induzidos, por exemplo, por xenobióticos (MULLEN *et al.*, 2014). Diante destes resultados faz-se necessária a análise dos efeitos do mesoiônico sobre as enzimas isocitrato desidrogenase isoformas 1 (citossólica) - que catalisam a carboxilação redutiva dependente de NADPH do α -cetoglutarato a isocitrato-, aconitase - que catalisa a hidratação do isocitrato a citrato -, e citrato liase que catalisa a reação de clivagem do citrato em Acetil-CoA e oxalacetato.

Como resultado da significativa inibição da respiração em meio GAL, os níveis de ATP foram reduzidos e em resposta, a via glicolítica parece ter sido ativada, como sugerido pelos elevados níveis de lactato e reduzidos níveis de piruvato. Interessantemente, em hepatócitos não tumorais tratados com SYD-1 na maior concentração (50 μ M), houve um aumento significativo em ambos os níveis de lactato e piruvato (BRANDT, 2012), evidenciando diferentes padrões de resposta em células normais e tumorais, que merece ser investigado. Além disso, resultados de metabolômica utilizando ^{13}C -glucose demonstraram um aumento na quantidade de metabólitos do ciclo de Krebs com aparente acúmulo de succinato (FIGURA 20). Isso pode ser outro efeito derivado da inibição causada pelo

SYD-1 sobre a respiração, uma vez que a succinato desidrogenase é parte integrante da cadeia respiratória. Ainda, a redução nos níveis de α -cetoglutarato e succinato em relação ao citrato, indica possível desvio deste último metabólito para a síntese de ácidos graxos, bem como a inibição de algumas enzimas do ciclo de Krebs. Para que esta hipótese seja confirmada, é importante avaliar a atividade das enzimas do ciclo de Krebs bem como a acetil-CoA carboxilase (catalisa a formação de malonil-CoA).

Sabe-se que a disfunção mitocondrial leva a um aumento na produção de ROS, uma vez que a mitocôndria é a principal fonte produtora destas espécies. O excesso de ROS pode levar a danos no DNA e ativar a via apoptótica mitocondrial (apoptose intrínseca). O tratamento com SYD-1 inibe expressivamente a respiração celular de células HepG2, o que poderia aumentar consideravelmente a concentração de ROS intracelular. Desta maneira, não é surpresa que a expressão de vários genes relacionados com a defesa antioxidante esteja aumentada após tratamento com SYD-1 (FIGURA 24). No entanto, não foi possível observar ativação da via apoptótica através da metodologia de FACS (marcação com anexina-V e iodeto de propídio). Por outro lado, SYD-1 (50 μ M) aumentou a expressão da proteína caspase-3 total em células HepG2 mantidas em meio AG, o que indica indução do processo apoptótico nestas células. No entanto, o mesmo não é observado quando o meio utilizado foi o GAL. Nestas células, a expressão dos níveis da proteína estão significativamente reduzidos, bem como os níveis de ATP intracelulares, o que pode estar limitando o desencadeamento do processo apoptótico, uma vez que este processo necessita de energia para ser ativado (EGUCHI *et al.*, 1997). Uma outra possibilidade, é que o processo de indução de morte ativado nestas células seja independente da ação de caspases, conhecido como necroptose. O exato mecanismo que direciona para a progressão desta via de morte ainda é pouco conhecido (MENG *et al.*, 2016), no entanto, já é estabelecido que esta forma regulada de necrose pode ser desencadeada por múltiplos fatores, incluindo a

família de citocinas TNF (fator de necrose tumoral), como TNF, TRAIL e FasL e que depende da formação de um complexo proteico chamado necrosoma. Para que este complexo seja formado, é necessário que haja ligação de RIPK1 (proteína de interação de receptores cinase 1) e RIPK3 (proteína de interação de receptores cinase 3), resultando em autofosforilação de ambas as proteínas cinases e recrutamento e forforilação da pseudocinase MLKL, resultando na ruptura de membrana (HE *et al.*, 2016; OBERST, 2016). Assim, para confirmar a hipótese que o processo necrotótico esteja sendo ativado em células HepG2 tratadas e cultivadas em meio GAL, é necessário que análises futuras sejam realizadas para avaliar RIPK1, RIPK3 e MLKL.

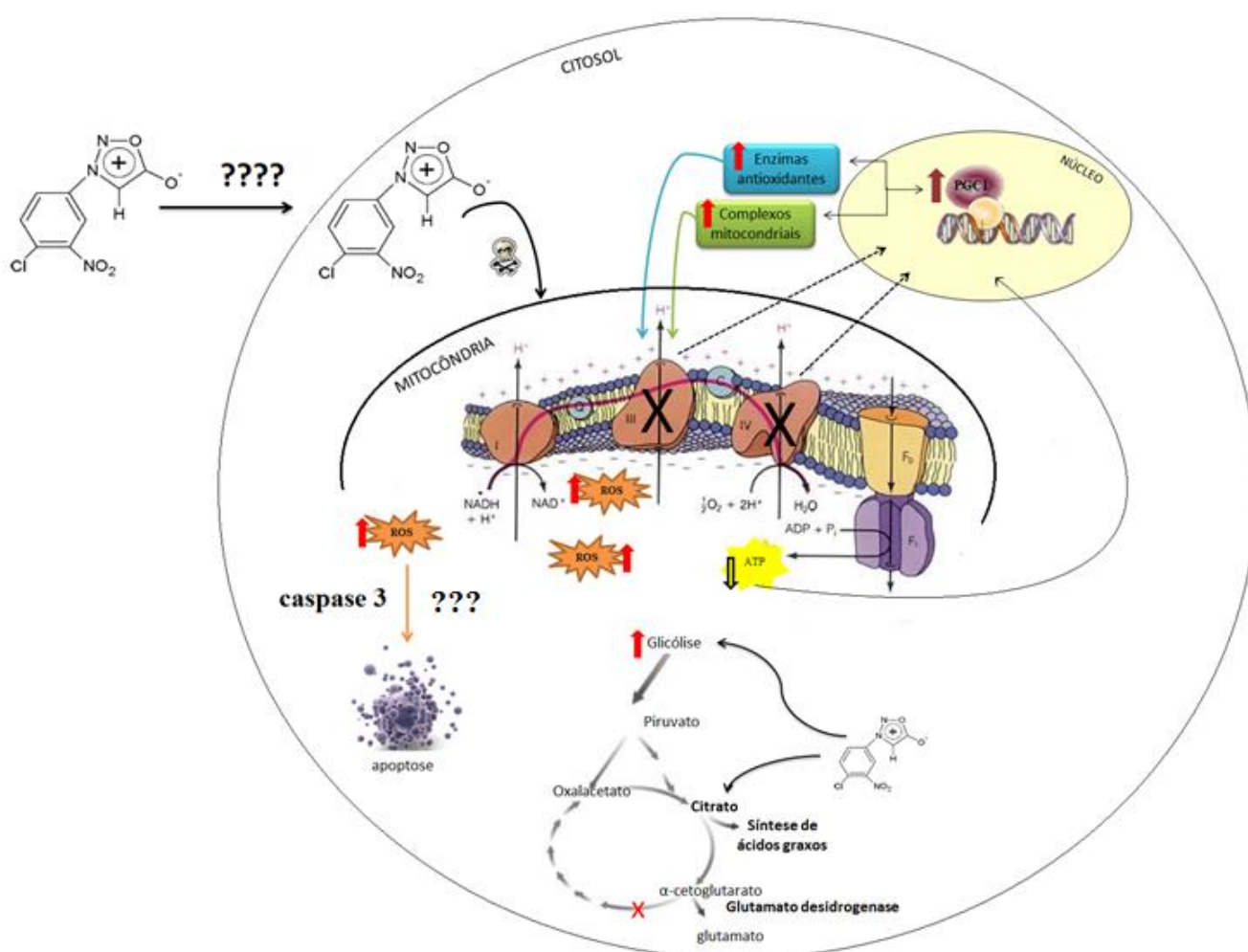
Somando-se a isso, a expressão de PGC1 α e PGC1 β , coativadores transcricionais envolvidos com a indução do metabolismo mitocondrial, bem como seus alvos downstream foram ativados pelo SYD-1 no tratamento de 72 h (FIGURA 23). Este estímulo, pode ocorrer em resposta a citotoxicidade induzida pelo SYD-1 sobre a mitocôndria, bem como à redução nos níveis de ATP.

Além disso, SYD-1 parece não ser transportado pelos principais transportadores multidrogas glicoproteína-P, ABCG2 e MRP1, e ainda, inibiu a atividade de ABCG2, representando uma promissora possibilidade para o tratamento de CHC resistente. Tal como observado após tratamento com SYD-1, o tratamento de células HepG2 com o composto MI-J (25 μ M) por 24 h reduziu a viabilidade destas células, induziu a morte celular por apoptose, e não foi transportado pelos principais transportadores de múltiplas drogas (GOZZI *et al.*, 2015).

A partir dos resultados obtidos neste estudo e com base em alguns dados da literatura (HALILA *et al.*, 2007; GOZZI *et al.*, 2013), uma proposta de integração dos efeitos do SYD-1 que culminariam em sua toxicidade nas células HepG2, bem como os

efeitos desencadeados em resposta a esta toxicidade - no sentido de manter a sobrevivência celular, está representada na FIGURA 25.

FIGURA 25: POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO DO SYD-1 EM CÉLULAS HEPG2



FONTE: o autor (2016)

NOTA: SYD-1 permeia as membranas celular e mitocondriais (devido as características químicas dos mesoiônicos), e na mitocôndria inibe o transporte de elétrons através da cadeia respiratória a partir do complexo I, nos complexos III e IV (HALILA *et al.*, 2007), resultando na inibição da respiração com consequente aumento na produção de ROS e diminuição nos níveis de ATP. Esta disfunção, leva a um aumento na expressão de PGC1 α e PGC1 β e seus alvos *downstream*, culminando no aumento da atividade do sistema antioxidante celular (para manter o controle dos níveis ROS), bem como aumento de expressão dos complexos da cadeia (para compensar o efeito inibitório). Além disso, o aumento nos níveis de ROS podem desencadear a morte celular por apoptose mediado por caspase 3. SYD-1 ainda parece inibir o ciclo de krebs, estimular a via glicolítica e desviar o citrato para síntese de ácidos graxos.

8. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que:

- 1) SYD-1, na menor concentração (25 μ M), não exerce efeito sobre a viabilidade de hepatócitos não tumorais em cultura, porém, na maior concentração (50 μ M) induz a apoptose, sugerindo a seletividade do composto em baixas concentrações.
- 2) Os efeitos do SYD-1 em células HepG2 são mais pronunciados quando o meio de cultura contém galactose e glutamina em substituição a glucose, indicando que o comprometimento da fosforilação oxidativa está relacionado à sua citotoxicidade;
- 3) SYD-1 parece interferir na atividade de enzimas do ciclo de Krebs e, desta forma, altera também o metabolismo da glutamina por esta via;
- 4) A inibição da respiração celular causada pelo SYD-1 parece ser compensada pelo aumento da atividade da via glicolítica e da expressão de PGC1 α , PGC1 β e seus alvos downstream NFR1, NFR2 e Ndufb5;
- 5) O tratamento com o mesoiônico aumenta a expressão de genes relacionados com a defesa antioxidante celular (CAT, PRX5, GCLC, GSS, GPX3, TRX3, SOD1, SOD2, SOD3);
- 6) SYD-1 não é substrato para os transportadores ABC, o que motiva futuros estudos sobre o mecanismo de ação deste composto, visando sua aplicação clínica.

REFERÊNCIAS

- ABOLHODA, A.; WILSON, A. E.; ROSS, H.; DANENBERG, P. V.; BURT, M.; SCOTTO, K. W. Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. **Clin Cancer Res.** v. 5, n. 11, p. 3352-3356, 1999.
- ADEN, D. P.; FOGEL, A.; PLOTKIN, S.; DAMJANOV, I.; KNOWLES, B. B. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. **Nature.** v. 282, n. 5739, p. 615-616, 1979.
- ASUNDARIA, S. T.; PATEL, K. C. Synthesis and characterization of some sulfonamide based bis-sydnone and their in vitro antimicrobial activity. **Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry.** v. 49, n. 7, p. 960-964, 2010.
- AUSTIN, S.; ST-PIERRE, J. PGC1alpha and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. **J Cell Sci.** v. 125, n. Pt 21, p. 4963-4971, 2012.
- BADAMI, B. V. Mesoionic Compounds An Unconventional Class of Aromatic Heterocycles. **Resonance.** v. n. p. 40-48, 2006.
- BARBOSA, I. A.; MACHADO, N. G.; SKILDUM, A. J.; SCOTT, P. M.; OLIVEIRA, P. J. Mitochondrial remodeling in cancer metabolism and survival: potential for new therapies. **Biochim Biophys Acta.** v. 1826, n. 1, p. 238-254, 2012.
- BARELIER, S.; LINARD, D.; PONS, J.; CLIPPE, A.; KNOOPS, B.; LANCELIN, J. M.; KRIMM, I. Discovery of fragment molecules that bind the human peroxiredoxin 5 active site. **PLoS One.** v. 5, n. 3, p. e9744, 2010.
- BHALLA, K.; HWANG, B. J.; DEWI, R. E.; OU, L.; TWADDEL, W.; FANG, H. B.; VAFAI, S. B.; VAZQUEZ, F.; PUIGSERVER, P.; BOROS, L.; GIRNUN, G. D. PGC1alpha promotes tumor growth by inducing gene expression programs supporting lipogenesis. **Cancer Res.** v. 71, n. 21, p. 6888-6898, 2011.
- BLACKMAN, R. K.; CHEUNG-ONG, K.; GEBBIA, M.; PROIA, D. A.; HE, S.; KEPROS, J.; JONNEAUX, A.; MARCHETTI, P.; KLUZA, J.; RAO, P. E.; WADA, Y.; GIAEVER, G.; NISLOW, C. Mitochondrial electron transport is the cellular target of the oncology drug elesclomol. **PLoS One.** v. 7, n. 1, p. e29798, 2012.
- BOKHARI, M.; CARNACHAN, R. J.; CAMERON, N. R.; PRZYBORSKI, S. A. Culture of HepG2 liver cells on three dimensional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge. **J Anat.** v. 211, n. 4, p. 567-576, 2007.
- BOSTROM, P.; WU, J.; JEDRYCHOWSKI, M. P.; KORDE, A.; YE, L.; LO, J. C.; RASBACH, K. A.; BOSTROM, E. A.; CHOI, J. H.; LONG, J. Z.; KAJIMURA, S.; ZINGARETTI, M. C.; VIND, B. F.; TU, H.; CINTI, S.; HOJLUND, K.; GYGI, S. P.; SPIEGELMAN, B. M. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature.** v. 481, n. 7382, p. 463-468, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** v. 72, n. p. 248-254, 1976.

BRANDT, A. P. **Efeitos da sidnona SYD-1sobre alguns parâmetros metabólicos ligados à provisão de energia em células de hepatoma (HepG2) e hepatócitos.** Mestrado. Bioquímica e Biologia Molecular - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

BRANDT, A. P. **Efeitos da sidnona SYD-1sobre alguns parâmetros metabólicos ligados à provisão de energia em células de hepatoma (HepG2) e hepatócitos.** Mestra. Bioquímica - Universidade Federal de Paraná, 2012.

BRASIL, M. D. S. (2014-2015). Estimativas 2014: Incidência de Câncer no Brasil. CÂNCER, I. N. D. C. C. D. P. E. V. D. Rio de Janeiro, INCA.

BRUIX, J.; REIG, M.; SHERMAN, M. Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma. **Gastroenterology.** v. 150, n. 4, p. 835-853, 2016.

BUPATHI, M.; KASEB, A.; MERIC-BERNSTAM, F.; NAING, A. Hepatocellular carcinoma: Where there is unmet need. **Mol Oncol.** v. 9, n. 8, p. 1501-1509, 2015.

BUTKOVIĆ, K. M., ŽELJKO; ŠINDLER-KULYKA, MARIJA. Synthesis of 3-(o-stilbenyl)sydnone and 3-(o-stilbenyl)-4-substituted-sydnone derivatives and their antitumor evaluation. **ARKIVOC.** v. n. p. 1-15, 2011.

CAITO, S. W.; ASCHNER, M. Mitochondrial Redox Dysfunction and Environmental Exposures. **Antioxid Redox Signal.** v. 23, n. 6, p. 578-595, 2015.

CARDARELLI, C. O.; AKSENTIJEVICH, I.; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M. M. Differential effects of P-glycoprotein inhibitors on NIH3T3 cells transfected with wild-type (G185) or mutant (V185) multidrug transporters. **Cancer Res.** v. 55, n. 5, p. 1086-1091, 1995.

CHANDRASEKHAR, R.; NANJAN, M. J. Sydnones: a brief review. **Mini Rev Med Chem.** v. 12, n. 13, p. 1359-1365, 2012.

CHEN, S.; CHENG, A. C.; WANG, M. S.; PENG, X. Detection of apoptosis induced by new type gosling viral enteritis virus in vitro through fluorescein annexin V-FITC/PI double labeling. **World J Gastroenterol.** v. 14, n. 14, p. 2174-2178, 2008.

CHEN, Z. L.; SHI, T. L.; ZHANG, L.; ZHU, P. L.; DENG, M. Y.; HUANG, C.; HU, T. T.; JIANG, L.; LI, J. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. **Cancer Letters.** v. 370, n. 1, p. 153-164, 2016.

CHENG, G.; ZIELONKA, J.; OUARI, O.; LOPEZ, M.; MCALLISTER, D.; BOYLE, K.; BARRIOS, C. S.; WEBER, J. J.; JOHNSON, B. D.; HARDY, M.; DWINELL, M. B.; KALYANARAMAN, B. Mitochondria-Targeted Analogues of Metformin Exhibit Enhanced Antiproliferative and Radiosensitizing Effects in Pancreatic Cancer Cells. **Cancer Res.** v. 76, n. 13, p. 3904-3915, 2016.

CHIBA, K.; KAWAKAMI, K.; TOHYAMA, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. **Toxicology in Vitro**. v. 12, n. 3, p. 251-258, 1998.

CHO, Y. K.; KIM, J. K.; KIM, M. Y.; RHIM, H.; HAN, J. K. Systematic review of randomized trials for hepatocellular carcinoma treated with percutaneous ablation therapies. **Hepatology**. v. 49, n. 2, p. 453-459, 2009.

DEMINE, S.; REDDY, N.; RENARD, P.; RAES, M.; ARNOULD, T. Unraveling biochemical pathways affected by mitochondrial dysfunctions using metabolomic approaches. **Metabolites**. v. 4, n. 3, p. 831-878, 2014.

DESHPANDE, S. R.; PAI, K. V. Fluorine bearing sydnones with styryl ketone group: synthesis and their possible analgesic and anti-inflammatory activities. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v. 27, n. 2, p. 241-248, 2012.

DONATO, M. T.; LAHOZ, A.; CASTELL, J. V.; GOMEZ-LECHON, M. J. Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. **Curr Drug Metab**. v. 9, n. 1, p. 1-11, 2008.

DOYLE, A.; MARSH, P.; GILL, R.; RODOV, M.; MOHSEN, W.; VARMA, P.; HONG, T.; STRASSER, S. I.; BELL, S.; RYAN, M.; NICOLL, A.; LUBEL, J.; GOW, P. J.; FINK, M. A.; ROBERTS, S.; KEMP, W.; KRONBORG, I.; ARACHCHI, N.; KNIGHT, V.; DEV, A. Sorafenib in the treatment of hepatocellular carcinoma: a multi-centre real-world study. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. v. 51, n. 8, p. 979-985, 2016.

DULBECCO, R.; FREEMAN, G. PLAQUE PRODUCTION BY THE POLYOMA VIRUS. **Virology**. v. 8, n. 3, p. 396-397, 1959.

DUNKLEY, C. S.; THOMAN, C. J. Synthesis and biological evaluation of a novel phenyl substituted sydnone series as potential antitumor agents. **Bioorg Med Chem Lett**. v. 13, n. 17, p. 2899-2901, 2003.

DUSEJA, A. Staging of hepatocellular carcinoma. **J Clin Exp Hepatol**. v. 4, n. Suppl 3, p. S74-79, 2014.

EGUCHI, Y.; SHIMIZU, S.; TSUJIMOTO, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. **Cancer Res**. v. 57, n. 10, p. 1835-1840, 1997.

EJENDAL, K. F.; HRYCYNA, C. A. Multidrug resistance and cancer: the role of the human ABC transporter ABCG2. **Curr Protein Pept Sci**. v. 3, n. 5, p. 503-511, 2002.

ERAY, M.; MATTO, M.; KAARTINEN, M.; ANDERSSON, L.; PELKONEN, J. Flow cytometric analysis of apoptotic subpopulations with a combination of annexin V-FITC, propidium iodide, and SYTO 17. **Cytometry**. v. 43, n. 2, p. 134-142, 2001.

EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE, L.; EUROPEAN ORGANISATION FOR, R.; TREATMENT OF, C. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. **J Hepatol**. v. 56, n. 4, p. 908-943, 2012.

FANG, J.; SEKI, T.; MAEDA, H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 61, n. 4, p. 290-302, 2009.

FEOKTISTOVA, M.; GESERICK, P.; LEVERKUS, M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. **Cold Spring Harb Protoc**. v. 2016, n. 4, p. pdb prot087379, 2016.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**. v. 136, n. 5, p. E359-386, 2015.

FISHER, K. W.; DAS, B.; KIM, H. S.; CLYMER, B. K.; GEHRING, D.; SMITH, D. R.; COSTANZO-GARVEY, D. L.; FERNANDEZ, M. R.; BRATTAIN, M. G.; KELLY, D. L.; MACMILLAN, J.; WHITE, M. A.; LEWIS, R. E. AMPK Promotes Aberrant PGC1beta Expression To Support Human Colon Tumor Cell Survival. **Mol Cell Biol**. v. 35, n. 22, p. 3866-3879, 2015.

FITZMORRIS, P.; SHOREIBAH, M.; ANAND, B. S.; SINGAL, A. K. Management of hepatocellular carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol**. v. 141, n. 5, p. 861-876, 2015.

FORBES, A. M.; LIN, H.; MEADOWS, G. G.; MEIER, G. P. Synthesis and anticancer activity of new flavonoid analogs and inconsistencies in assays related to proliferation and viability measurements. **Int J Oncol**. v. 45, n. 2, p. 831-842, 2014.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicol Lett**. v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

GACH, K.; DUGOSZ, A.; JANECKA, A. The role of oxidative stress in anticancer activity of sesquiterpene lactones. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. v. 388, n. 5, p. 477-486, 2015.

GALUPPO, L. F.; DOS REIS LIVERO, F. A.; MARTINS, G. G.; CARDOSO, C. C.; BELTRAME, O. C.; KLASSEN, L. M.; CANUTO, A. V.; ECHEVARRIA, A.; TELLES, J. E.; KLASSEN, G.; ACCO, A. Sydnone 1: A Mesoionic Compound with Antitumoral and Haematological Effects In Vivo. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. v. 119, n. 1, p. 41-50, 2016.

GLOVER, C. J.; RABOW, A. A.; ISGOR, Y. G.; SHOEMAKER, R. H.; COVELL, D. G. Data mining of NCI's anticancer screening database reveals mitochondrial complex I inhibitors cytotoxic to leukemia cell lines. **Biochem Pharmacol**. v. 73, n. 3, p. 331-340, 2007.

GNAIGER, E. Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. **Respir Physiol**. v. 128, n. 3, p. 277-297, 2001.

GNAIGER, E. Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. **Int J Biochem Cell Biol**. v. 41, n. 10, p. 1837-1845, 2009.

GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? **Trends Cell Biol.** v. 18, n. 4, p. 165-173, 2008.

GOHIL, V. M.; SHETH, S. A.; NILSSON, R.; WOJTOVICH, A. P.; LEE, J. H.; PEROCCHI, F.; CHEN, W.; CLISH, C. B.; AYATA, C.; BROOKES, P. S.; MOOTHA, V. K. Nutrient-sensitized screening for drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis. **Nat Biotechnol.** v. 28, n. 3, p. 249-255, 2010.

GOMEZ-LECHON, M. J.; TOLOSA, L.; CONDE, I.; DONATO, M. T. Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. **Expert Opin Drug Metab Toxicol.** v. 10, n. 11, p. 1553-1568, 2014.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nat Rev Cancer.** v. 2, n. 1, p. 48-58, 2002.

GOZZI, G. J.; PIRES ADO, R.; MARTINEZ, G. R.; ROCHA, M. E.; NOLETO, G. R.; ECHEVARRIA, A.; CANUTO, A. V.; CADENA, S. M. The antioxidant effect of the mesoionic compound SYD-1 in mitochondria. **Chem Biol Interact.** v. 205, n. 3, p. 181-187, 2013.

GOZZI, G. J.; PIRES ADO, R.; VALDAMERI, G.; ROCHA, M. E.; MARTINEZ, G. R.; NOLETO, G. R.; ACCO, A.; ALVES DE SOUZA, C. E.; ECHEVARRIA, A.; MORETTO DOS REIS, C.; DI PIETRO, A.; SUTER CORREIA CADENA, S. M. Selective Cytotoxicity of 1,3,4-Thiadiazolium Mesoionic Derivatives on Hepatocarcinoma Cells (HepG2). **PLoS One.** v. 10, n. 6, p. e0130046, 2015.

GRANDHI, M. S.; KIM, A. K.; RONNEKLEIV-KELLY, S. M.; KAMEL, I. R.; GHASEBEH, M. A.; PAWLIK, T. M. Hepatocellular carcinoma: From diagnosis to treatment. **Surg Oncol.** v. 25, n. 2, p. 74-85, 2016.

GRYNBERG, N.; GOMES, R.; SHINZATO, T.; ECHEVARRIA, A.; MILLER, J. Some new aryl-sydnone: effects on murine tumours. **Anticancer Res.** v. 12, n. 3, p. 1025-1028, 1992.

HALILA, G. C.; DE OLIVEIRA, M. B.; ECHEVARRIA, A.; BELEM, A. C.; ROCHA, M. E.; CARNIERI, E. G.; MARTINEZ, G. R.; NOLETO, G. R.; CADENA, S. M. Effect of sydnone SYD-1, a mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria. **Chem Biol Interact.** v. 169, n. 3, p. 160-170, 2007.

HALL, M. D.; HANDLEY, M. D.; GOTTESMAN, M. M. Is resistance useless? Multidrug resistance and collateral sensitivity. **Trends Pharmacol Sci.** v. 30, n. 10, p. 546-556, 2009.

HATZARAS, I.; BISCHOF, D. A.; FAHY, B.; COSGROVE, D.; PAWLIK, T. M. Treatment options and surveillance strategies after therapy for hepatocellular carcinoma. **Ann Surg Oncol.** v. 21, n. 3, p. 758-766, 2014.

HE, S. D.; HUANG, S.; SHEN, Z. R. Biomarkers for the detection of necroptosis. **Cellular and Molecular Life Sciences.** v. 73, n. 11-12, p. 2177-2181, 2016.

HOUTEN, S. M.; AUWERX, J. PGC-1 α : turbocharging mitochondria. **Cell.** v. 119, n. 1, p. 5-7, 2004.

HUTTER, E.; UNTERLUGGAUER, H.; GAREDEW, A.; JANSEN-DURR, P.; GNAIGER, E. High-resolution respirometry--a modern tool in aging research. **Exp Gerontol.** v. 41, n. 1, p. 103-109, 2006.

I. GUTMANN, W. A. W. L-(+)-Lactate Determination with Lactate Dehydrogenase and NAD. **Methods Enzym. Anal, Weinheim** v. n. p. 1464–1469, 1974.

JAGER, S.; HANDSCHIN, C.; ST-PIERRE, J.; SPIEGELMAN, B. M. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 104, n. 29, p. 12017-12022, 2007.

KALLURAYA, B.; RAHIMAN, A. M.; BANJI, D. Sydnone derivatives. Part VII: Synthesis of some novel thiazoles and their pharmacological properties. **Arch Pharm (Weinheim).** v. 334, n. 8-9, p. 263-268, 2001.

KARTAL-YANDIM, M.; ADAN-GOKBULUT, A.; BARAN, Y. Molecular mechanisms of drug resistance and its reversal in cancer. **Crit Rev Biotechnol.** v. 36, n. 4, p. 716-726, 2016.

KIER, L. B.; ROCHE, E. B. Medicinal chemistry of the mesoionic compounds. **J Pharm Sci.** v. 56, n. 2, p. 149-168, 1967.

KNUTTI, D.; KRALLI, A. PGC-1, a versatile coactivator. **Trends Endocrinol Metab.** v. 12, n. 8, p. 360-365, 2001.

KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C. P.; KUIJTEN, G. A.; KEEHNEN, R. M.; PALS, S. T.; VAN OERS, M. H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood.** v. 84, n. 5, p. 1415-1420, 1994.

LA SPADA, A. R. PPARGC1A/PGC-1alpha, TFEB and enhanced proteostasis in Huntington disease: defining regulatory linkages between energy production and protein-organelle quality control. **Autophagy.** v. 8, n. 12, p. 1845-1847, 2012.

LAFARO, K. J.; DEMIRJIAN, A. N.; PAWLIK, T. M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. **Surg Oncol Clin N Am.** v. 24, n. 1, p. 1-17, 2015.

LEE, H. J.; SU, Y.; LUI, W. Y.; CHAU, G. Y.; YIN, P. H.; LEE, H. C.; CHI, C. W. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC-1alpha) upregulated E-cadherin expression in HepG2 cells. **FEBS Lett.** v. 582, n. 5, p. 627-634, 2008.

LENTZ, B. R.; BARENHOLZ, Y.; THOMPSON, T. E. FLUORESCENCE DEPOLARIZATION STUDIES OF PHASE-TRANSITIONS AND FLUIDITY IN PHOSPHOLIPID BILAYERS .1. SINGLE COMPONENT PHOSPHATIDYLCHOLINE LIPOSOMES. **Biochemistry.** v. 15, n. 20, p. 4521-4528, 1976.

LERIN, C.; RODGERS, J. T.; KALUME, D. E.; KIM, S. H.; PANDEY, A.; PUIGSERVER, P. GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1alpha. **Cell Metab.** v. 3, n. 6, p. 429-438, 2006.

LIN, J.; HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. **Cell Metab.** v. 1, n. 6, p. 361-370, 2005.

LIN, S. M.; LIN, C. J.; LIN, C. C.; HSU, C. W.; CHEN, Y. C. Radiofrequency ablation improves prognosis compared with ethanol injection for hepatocellular carcinoma ≤ 4 cm. **Gastroenterology.** v. 127, n. 6, p. 1714-1723, 2004.

LIU, C.; LIN, J. D. PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).** v. 43, n. 4, p. 248-257, 2011.

LLOVET, J. M.; RICCI, S.; MAZZAFERRO, V.; HILGARD, P.; GANE, E.; BLANC, J. F.; DE OLIVEIRA, A. C.; SANTORO, A.; RAOUL, J. L.; FORNER, A.; SCHWARTZ, M.; PORTA, C.; ZEUZEM, S.; BOLONDI, L.; GRETEN, T. F.; GALLE, P. R.; SEITZ, J. F.; BORBATH, I.; HAUSSINGER, D.; GIANNARIS, T.; SHAN, M.; MOSCOVICI, M.; VOLIOTIS, D.; BRUIX, J.; GROUP, S. I. S. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. **N Engl J Med.** v. 359, n. 4, p. 378-390, 2008.

LLOVET, J. M.; ZUCMAN-ROSSI, J.; PIKARSKY, E.; SANGRO, B.; SCHWARTZ, M.; SHERMAN, M.; GORES, G. Hepatocellular carcinoma. **Nat Rev Dis Primers.** v. 2, n. p. 16018, 2016.

MAHATO, R.; TAI, W.; CHENG, K. Prodrugs for improving tumor targetability and efficiency. **Adv Drug Deliv Rev.** v. 63, n. 8, p. 659-670, 2011.

MALLUR, P. S.; LALWANI, A. K. Fluctuating corticosteroid-responsive auditory neuropathy/dyssynchrony is suggestive of central nervous system pathology. **Otol Neurotol.** v. 28, n. 8, p. 1002-1004, 2007.

MARCHAN, R.; HAMMOND, C. L.; BALLATORI, N. Multidrug resistance-associated protein 1 as a major mediator of basal and apoptotic glutathione release. **Biochim Biophys Acta.** v. 1778, n. 10, p. 2413-2420, 2008.

MARROQUIN, L. D.; HYNES, J.; DYKENS, J. A.; JAMIESON, J. D.; WILL, Y. Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. **Toxicol Sci.** v. 97, n. 2, p. 539-547, 2007.

MARTINEZ, L.; ARNAUD, O.; HENIN, E.; TAO, H.; CHAPTAL, V.; DOSHI, R.; ANDRIEU, T.; DUSSURGEY, S.; TOD, M.; DI PIETRO, A.; ZHANG, Q.; CHANG, G.; FALSON, P. Understanding polyspecificity within the substrate-binding cavity of the human multidrug resistance P-glycoprotein. **FEBS J.** v. 281, n. 3, p. 673-682, 2014.

MASAMI KAWASE, H. S., NOBORUS MOTOHASHI. The Chemistry of Bioactive Mesoionic Heterocycle. **Top Heterocycl Chem.** v. 16, n. p. 135-152, 2009.

MCINTOSH, K.; BALCH, C.; TIWARI, A. K. Tackling multidrug resistance mediated by efflux transporters in tumor-initiating cells. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.** v. 12, n. 6, p. 633-644, 2016.

MENG, M. B.; WANG, H. H.; CUI, Y. L.; WU, Z. Q.; SHI, Y. Y.; ZAORSKY, N. G.; DENG, L.; YUAN, Z. Y.; LU, Y.; WANG, P. Necroptosis in tumorigenesis, activation of anti-tumor immunity, and cancer therapy. **Oncotarget.** v. 7, n. 35, p. 57391-57413, 2016.

MILEO, A. M.; MICCADEI, S. Polyphenols as Modulator of Oxidative Stress in Cancer Disease: New Therapeutic Strategies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. n. p. 17, 2016.

MIN, W.; XU, L. K.; ZHOU, H. J.; HUANG, Q.; ZHANG, H.; HE, Y.; ZHE, X.; LUO, Y. Thioredoxin and redox signaling in vasculature-studies using Trx2 endothelium-specific transgenic mice. **Methods Enzymol**. v. 474, n. p. 315-324, 2010.

MONTEIRO, J. P.; MARTINS, A. F.; LUCIO, M.; REIS, S.; GERALDES, C. F.; OLIVEIRA, P. J.; JURADO, A. S. Interaction of carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) with lipid membrane systems: a biophysical approach with relevance to mitochondrial uncoupling. **J Bioenerg Biomembr**. v. 43, n. 3, p. 287-298, 2011.

MORITA, M.; GRAVEL, S. P.; CHENARD, V.; SIKSTROM, K.; ZHENG, L.; ALAIN, T.; GANDIN, V.; AVIZONIS, D.; ARGUELLO, M.; ZAKARIA, C.; MCLAUGHLAN, S.; NOUET, Y.; PAUSE, A.; POLLAK, M.; GOTTLIEB, E.; LARSSON, O.; ST-PIERRE, J.; TOPISIROVIC, I.; SONENBERG, N. mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. **Cell Metab**. v. 18, n. 5, p. 698-711, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MULIER, S.; NI, Y.; JAMART, J.; RUERS, T.; MARCHAL, G.; MICHEL, L. Local recurrence after hepatic radiofrequency coagulation: multivariate meta-analysis and review of contributing factors. **Ann Surg**. v. 242, n. 2, p. 158-171, 2005.

MULLEN, A. R.; HU, Z.; SHI, X.; JIANG, L.; BOROUGHS, L. K.; KOVACS, Z.; BORIACK, R.; RAKHEJA, D.; SULLIVAN, L. B.; LINEHAN, W. M.; CHANDEL, N. S.; DEBERARDINIS, R. J. Oxidation of Alpha-Ketoglutarate Is Required for Reductive Carboxylation in Cancer Cells with Mitochondrial Defects. **Cell Reports**. v. 7, n. 5, p. 1679-1690, 2014.

NATARAJAN, A. T.; DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. **Mutagenesis**. v. 6, n. 5, p. 399-403, 1991.

NEWTON, C. G. R., C.A. ., V., N.20. Meso-ionic heterocycles. **Tetrahedron, Kidlington**. v. 38, n. 20, p. 2965-3011, 1982.

NICHOLLS, D. G. F., STUART J. . **Bioenergetics 4**. Elsevier, 2013.

OBERST, A. Death in the fast lane: what's next for necroptosis? **Febs Journal**. v. 283, n. 14, p. 2616-2625, 2016.

OLLIS, W. D. R., C. A. . Meso-ionic compounds. **Advances in Heterocyclic Chemistry**. v. 19, n. 1, p. 1-121, 1976.

PAIVA RDE, O.; KNEIPP, L. F.; DOS REIS, C. M.; ECHEVARRIA, A. Mesoionic compounds with antifungal activity against *Fusarium verticillioides*. **BMC Microbiol**. v. 15, n. p. 11, 2015.

PIRES ADO, R.; NOLETO, G. R.; ECHEVARRIA, A.; DOS REIS, C. M.; ROCHA, M. E.; CARNIERI, E. G.; MARTINEZ, G. R.; CADENA, S. M. Interaction of 1,3,4-thiadiazolium mesoionic derivatives with mitochondrial membrane and scavenging activity: Involvement of their effects on mitochondrial energy-linked functions. **Chem Biol Interact.** v. 189, n. 1-2, p. 17-25, 2011.

PUIGSERVER, P. Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1- α . **Int J Obes (Lond).** v. 29 Suppl 1, n. p. S5-9, 2005.

PUIGSERVER, P.; ADELMANT, G.; WU, Z.; FAN, M.; XU, J.; O'MALLEY, B.; SPIEGELMAN, B. M. Activation of PPAR γ coactivator-1 through transcription factor docking. **Science.** v. 286, n. 5443, p. 1368-1371, 1999.

PUIGSERVER, P.; WU, Z.; PARK, C. W.; GRAVES, R.; WRIGHT, M.; SPIEGELMAN, B. M. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell.** v. 92, n. 6, p. 829-839, 1998.

PUIGSERVER, P. E. S., B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): transcriptional coactivator and metabolic regulator. **Endocr Rev.** v. 24, n. 1, p. 78-90, 2003.

R. CZOC, W. L. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and d-glycerate-2-phosphate **Methods Enzym. Anal, Weinheim.** v. n. p. 1446-1451, 1974.

RANHOTRA, H. S. The orphan estrogen-related receptor α and metabolic regulation: new frontiers. **J Recept Signal Transduct Res.** v. 35, n. 6, p. 565-568, 2015.

RAZA, H.; JOHN, A.; BENEDICT, S. Acetylsalicylic acid-induced oxidative stress, cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial dysfunction in human hepatoma HepG2 cells. **Eur J Pharmacol.** v. 668, n. 1-2, p. 15-24, 2011.

RENNER, K.; AMBERGER, A.; KONWALINKA, G.; KOFLER, R.; GNAIGER, E. Changes of mitochondrial respiration, mitochondrial content and cell size after induction of apoptosis in leukemia cells. **Biochim Biophys Acta.** v. 1642, n. 1-2, p. 115-123, 2003.

RICE, A. J.; PARK, A.; PINKETT, H. W. Diversity in ABC transporters: Type I, II and III importers. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.** v. 49, n. 5, p. 426-437, 2014.

ROBEY RW, H. Y., MORISAKI K, NADJEM TA, RUNGE S, RISBOOD M, PORUCHYNSKY MS, BATES SE. Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity. **Br J Cancer.** v. 10, n. 89, p. 1971-1978, 2003.

RODGERS, J. T.; LERIN, C.; HAAS, W.; GYGI, S. P.; SPIEGELMAN, B. M.; PUIGSERVER, P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. **Nature.** v. 434, n. 7029, p. 113-118, 2005.

RODRIGUEZ-ANTONA, C.; DONATO, M. T.; BOOBIS, A.; EDWARDS, R. J.; WATTS, P. S.; CASTELL, J. V.; GOMEZ-LECHON, M. J. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. **Xenobiotica.** v. 32, n. 6, p. 505-520, 2002.

ROMERO-GARCIA, S.; MORENO-ALTAMIRANO, M. M.; PRADO-GARCIA, H.; SANCHEZ-GARCIA, F. J. Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance. **Front Immunol.** v. 7, n. p. 52, 2016.

ROSSIGNOL, R.; GILKERSON, R.; AGGELER, R.; YAMAGATA, K.; REMINGTON, S. J.; CAPALDI, R. A. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. **Cancer Res.** v. 64, n. 3, p. 985-993, 2004.

SAOTOME, K.; MORITA, H.; UMEDA, M. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. **Toxicol In Vitro.** v. 3, n. 4, p. 317-321, 1989.

SCANDURRA, F. M.; GNAIGER, E. Cell respiration under hypoxia: facts and artefacts in mitochondrial oxygen kinetics. **Adv Exp Med Biol.** v. 662, n. p. 7-25, 2010.

SCARPULLA, R. C. Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. **J Bioenerg Biomembr.** v. 29, n. 2, p. 109-119, 1997.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. **Current Biology.** v. 24, n. 10, p. R453-R462, 2014.

SCHILITZH, A. O. C.; LIMA, F. C. D. S. D.; ANDRADE, J. H. V.; OLIVEIRA, J. F. P.; SANTOS, M. D. O.; REBELO, M. S.; CUNHA, R. G.; REIS, R. D. S. (2015). Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. (INCA), I. N. D. C. J. A. G. D. S. Rio de Janeiro.

SCHONAFINGER, K. Heterocyclic NO prodrugs. **Farmaco.** v. 54, n. 5, p. 316-320, 1999.

SCHUMACKER, P. T. Reactive oxygen species in cancer cells: Live by the sword, die by the sword. **Cancer Cell.** v. 10, n. 3, p. 175-176, 2006.

SEGLEN, P. O. Preparation of isolated rat liver cells. **Methods Cell Biol.** v. 13, n. p. 29-83, 1976.

SENFF-RIBEIRO, A.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E. F.; FRANCO, C. R. C.; VEIGA, S. S.; OLIVEIRA, M. B. M. Cytotoxic effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on cell lines of human melanoma. **British Journal of Cancer.** v. 91, n. 2, p. 297-304, 2004.

SENFF-RIBEIRO, A.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E. F.; VEIGA, S. S.; OLIVEIRA, M. B. M. Effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on B16+F10 murine melanoma. **Melanoma Research.** v. 13, n. 5, p. 465-471, 2003.

SHAROM, F. J. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. **Pharmacogenomics.** v. 9, n. 1, p. 105-127, 2008.

SHIINA, S.; TAGAWA, K.; UNUMA, T.; TERANO, A. Percutaneous ethanol injection therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma. **AJR Am J Roentgenol.** v. 154, n. 5, p. 947-951, 1990.

SHIRYAEVA, A.; BAIDYUK, E.; ARKADIEVA, A.; OKOVITYY, S.; MOROZOV, V.; SAKUTA, G. Hepatocyte mitochondrion electron-transport chain alterations in CCl(4) and

alcohol induced hepatitis in rats and their correction with simvastatin. **J Bioenerg Biomembr.** v. 40, n. 1, p. 27-34, 2008.

SINGAL, A. G.; EL-SERAG, H. B. Hepatocellular Carcinoma From Epidemiology to Prevention: Translating Knowledge into Practice. **Clin Gastroenterol Hepatol.** v. 13, n. 12, p. 2140-2151, 2015.

ST-PIERRE, J.; LIN, J.; KRAUSS, S.; TARR, P. T.; YANG, R.; NEWGARD, C. B.; SPIEGELMAN, B. M. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. **J Biol Chem.** v. 278, n. 29, p. 26597-26603, 2003.

TAN, Z.; LUO, X.; XIAO, L.; TANG, M.; BODE, A. M.; DONG, Z.; CAO, Y. The Role of PGC1alpha in Cancer Metabolism and its Therapeutic Implications. **Mol Cancer Ther.** v. 15, n. 5, p. 774-782, 2016.

TENNANT, J. R. Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability. **Transplantation.** v. 2, n. p. 685-694, 1964.

TEYSSIER, C.; MA, H.; EMTER, R.; KRALLI, A.; STALLCUP, M. R. Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1alpha by arginine methylation. **Genes Dev.** v. 19, n. 12, p. 1466-1473, 2005.

TON, C.; HWANG, D. M.; DEMPSEY, A. A.; LIEW, C. C. Identification and primary structure of five human NADH-ubiquinone oxidoreductase subunits. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 241, n. 2, p. 589-594, 1997.

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin.** v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.

TOYOKUNI, S.; OKAMOTO, K.; YODOI, J.; HIAI, H. PERSISTENT OXIDATIVE STRESS IN CANCER. **Febs Letters.** v. 358, n. 1, p. 1-3, 1995.

TROTTER, P. J.; STORCH, J. 3- P-(6-PHENYL)-1,3,5-HEXATRIENYL PHENYLPROPIC ACID (PA-DPH) - CHARACTERIZATION AS A FLUORESCENT MEMBRANE PROBE AND BINDING TO FATTY-ACID BINDING-PROTEINS. **Biochimica Et Biophysica Acta.** v. 982, n. 1, p. 131-139, 1989.

VALDAMERI, G.; GENOUX-BASTIDE, E.; PERES, B.; GAUTHIER, C.; GUITTON, J.; TERREUX, R.; WINNISCHOFER, S. M. B.; ROCHA, M. E. M.; BOUMENDJEL, A.; DI PIETRO, A. Substituted Chromones as Highly Potent Nontoxic Inhibitors, Specific for the Breast Cancer Resistance Protein. **Journal of Medicinal Chemistry.** v. 55, n. 2, p. 966-970, 2012.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact.** v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VALLE, I.; ALVAREZ-BARRIENTOS, A.; ARZA, E.; LAMAS, S.; MONSALVE, M. PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. **Cardiovasc Res.** v. 66, n. 3, p. 562-573, 2005.

VELLINGA, T. T.; BOROVSKI, T.; DE BOER, V. C.; FATRAI, S.; VAN SCHELVEN, S.; TRUMPI, K.; VERHEEM, A.; SNOEREN, N.; EMMINK, B. L.; KOSTER, J.; RINKES, I. H.; KRANENBURG, O. SIRT1/PGC1 α -Dependent Increase in Oxidative Phosphorylation Supports Chemotherapy Resistance of Colon Cancer. **Clin Cancer Res.** v. 21, n. 12, p. 2870-2879, 2015.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J Immunol Methods.** v. 184, n. 1, p. 39-51, 1995.

WAGHC, S. K. B. S. R. D. R. D. Design, synthesis and cytotoxic activity evaluation of mesoionic 4-methoxyphenyl sydnone analogs against 60 human tumors cell lines. **Der Pharma Chemica,** v. 7, n. p. 306-318, 2015.

WALLBERG, A. E.; YAMAMURA, S.; MALIK, S.; SPIEGELMAN, B. M.; ROEDER, R. G. Coordination of p300-mediated chromatin remodeling and TRAP/mediator function through coactivator PGC-1 α . **Mol Cell.** v. 12, n. 5, p. 1137-1149, 2003.

WANG, Y.; LUO, Q.; LI, Y.; DENG, S.; WEI, S.; LI, X. Radiofrequency ablation versus hepatic resection for small hepatocellular carcinomas: a meta-analysis of randomized and nonrandomized controlled trials. **PLoS One.** v. 9, n. 1, p. e84484, 2014.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science.** v. 123, n. 3191, p. 309-314, 1956.

WESTERINK, W. M.; SCHOONEN, W. G. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. **Toxicol In Vitro.** v. 21, n. 8, p. 1581-1591, 2007.

WU, Z.; PUIGSERVER, P.; ANDERSSON, U.; ZHANG, C.; ADELMANT, G.; MOOTHA, V.; TROY, A.; CINTI, S.; LOWELL, B.; SCARPULLA, R. C.; SPIEGELMAN, B. M. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. **Cell.** v. 98, n. 1, p. 115-124, 1999.

XIA, F.; WU, L. L.; LAU, W. Y.; HUAN, H. B.; WEN, X. D.; MA, K. S.; LI, X. W.; BIE, P. Adjuvant sorafenib after hepatectomy for Barcelona Clinic Liver Cancer-stage C hepatocellular carcinoma patients. **World J Gastroenterol.** v. 22, n. 23, p. 5384-5392, 2016.

YIN, P. H.; LEE, H. C.; CHAU, G. Y.; WU, Y. T.; LI, S. H.; LUI, W. Y.; WEI, Y. H.; LIU, T. Y.; CHI, C. W. Alteration of the copy number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. **Br J Cancer.** v. 90, n. 12, p. 2390-2396, 2004.

ZAMAI, L.; FALCIERI, E.; MARHEFKA, G.; VITALE, M. Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptotic cells in the absence of nucleosomal DNA fragmentation. **Cytometry.** v. 23, n. 4, p. 303-311, 1996.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radic Biol Med.** v. 33, n. 3, p. 337-349, 2002.

ZHU, H.; CHEN, L.; ZHOU, W.; HUANG, Z.; HU, J.; DAI, S.; WANG, X.; HUANG, X.; HE, C. Over-expression of the ATP5J gene correlates with cell migration and 5-fluorouracil sensitivity in colorectal cancer. **PLoS One.** v. 8, n. 10, p. e76846, 2013.

ANEXO 1



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 548

CERTIFICADO

O Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "*Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA); and with the requirements of the "*Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*".

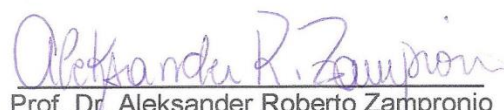
PROCESSO: 23075.085654/2011-98

APROVADO: 09/08/2011 – R.O. 07/2011

TÍTULO: Envolvimento da via mitocondrial na atividade antitumoral de derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos e sidhonas e sua seletividade celular

AUTORES: Sivia Maria Suter Correia Cadena, Guilhermina Rodrigues Noletto, Amanda do Rocio Andrade Pires, Alexandra Acco, Maria Eliane Merlin Rocha, Anna Paula Brandt, Lyvia Petz

DEPARTAMENTO: Bioquímica


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador do CEUA

ANEXO 2

Atividades desenvolvidas durante o doutorado:

Ajuda a alunos externos que resultou em paper:

✓ Danusa de Castro Damásio:

The lectin BJcuL induces apoptosis through TRAIL expression, caspase cascade activation and mitochondrial membrane permeability in a human colon adenocarcinoma cell line. *Toxicon* (Oxford). v.90, p.299 - 307, 2014.

✓ Aline Maria Stolf:

Effects of statins on liver cell function and inflammation in septic rats. *The Journal of Surgical Research*. v.178, p.888 - 897, 2012.

✓ Renata Miranda

Polyphenol-Rich Foods Alleviate Pain and Ameliorate Quality of Life in Fibromyalgia Women

✓ Ana Paula Abud: Paper em submissão.

Participação em eventos:

1. **45ª Reunião Annual da SBBq, 2016. (Congresso).**

* Metabolic profile analysis of adult stem cells derived from adipose tissue. Sydnone (SYD-1) toxicity in HepG2 cells is mediated by the Impairment of Mitochondrial Functions.

2. **Simpósio dos 50 Anos da Bioquímica. UFPR, 2015.**

* SYD-1 induces respiration dysfunction on HepG2 cells with oxidative phosphorylation pathway stimulated.

3. **1ª Mostra Anual de Pesquisa do Setor de Ciências Biológicas “Ciências no Espelho”**

* Cytotoxicity of SYD-1 on Human Hepatocellular Carcinoma Cells (HepG2) and Primary Rat Hepatocytes, 2014.

4. **Palestra: “Desvendando o PCR em tempo Real: princípios da técnica e**

conceitos sobre analyses e resultados”, UFPR 2014.

5. XLII Annual Meeting of SBBq, 2013. (Congresso)

- * Cytotoxicity of SYD-1 on Human Hepatocellular Carcinoma Cells (HepG2) and Primary Rat Hepatocytes.
- * Cytotoxicity of 1,3,4-thiadiazole Mesoionic Derivatives on Human Hepatocellular Carcinoma Cells (HepG2) compared to Primary Rat Hepatocytes.
- * Effects of Chalcone on Rat Liver Mitochondrial Bioenergetics.

6. Free Radical School, 2013.

- *The inhibitory effect of SYD-1 on state 3 respiration is related to releasing of NO from its structure.

7. VIII Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine - South American Group, 2013. (Congresso).

- * The inhibitory effect of SYD-1 on state 3 respiration is related to releasing of NO from its structure.

8. XLI Annual Meeting of SBBq, 2012. (Congresso).

- * Sydnone SYD-1 affects metabolic functions in isolated rat hepatocytes.

9. XLI Annual Meeting of SBBq, 2012. (Congresso).

- * The mesoionic compound SYD-1 impairs metabolic functions linked to energy provision in HepG2 cells.

Palestra e monitoria

- Palestra no minicurso: **Múltiplas abordagens na pesquisa envolvendo bioenergética mitocondrial, estresse oxidativo e morte celular**, durante a IV Semana Científica de Bioquímica da UFPR, 2016.
- Monitora na 1ª Mostra Anual de Pesquisa do Setor de Ciências Biológicas “Ciências no Espelho”
- Palestra: **Cultura de células HepG2 e Hepatócitos: aspectos metodológicos e funcionais**, na disciplina de bioquímica da turma de enfermagem, 2013.

- Monitora na **Disciplina de Cultivo de Células Animais (BQ709)**, 2013.

Organização de evento

- Disciplina de Cultivo de Células Animais (BQ709), 2013
- Mini- curso: Efeitos celulares frente ao estresse oxidativo: abordagem em células animais e vegetais, ministrado durante a I Semana Científica de Bioquímica da UFPR, 2013.

Participação em Comissão organizadora de eventos:

- Primeira Mostra Anual de Pesquisa do Setor de Ciências Biológicas Ciência no Espelho, UFPR, 2014.

Participação em bancas:

- Avaliação de trabalhos de iniciação científica durante o **21º Evento de Iniciação Científica e 6º Evento de Inovação Tecnológica da Universidade Federal do Paraná (21º EVINCI e 6º EINTI)**, 2013. Universidade Federal do Paraná - Curitiba

Orientação:

- Monografias de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização:

Douglas da Luz Nune. **Estudo Comparativo dos Níveis de Lactato e Creatinoquinase em Ratos após Consumo de Etanol: Desmistificando a ação do Lactato nos Eventos de dor Muscular Tardia Induzida Pelo Exercício Físico Após Consumo de Etanol**. 2014. Monografia (Pós-graduação lato sensu em Fisiologia Exercício) - Faculdade União das Américas – Foz do Iguaçu.

ANEXO 3

Licença de uso de material publicado com direitos autorais.

05/09/2016

RightsLink - Your Account

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 05, 2016

This Agreement between Anna Paula Brandt ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	3942670703982
License date	Sep 05, 2016
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Journal of Hepatology
Licensed Content Title	EASL–EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma
Licensed Content Author	European Association for the Study of the Liver, European Organisation for Research and Treatment of Cancer
Licensed Content Date	April 2012
Licensed Content Volume Number	56
Licensed Content Issue Number	4
Licensed Content Pages	36
Start Page	908
End Page	943
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Português
Order reference number	
Original figure numbers	Fig 3. Updated BCLC staging system and treatment strategy, 2011
Title of your thesis/dissertation	DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL E CITOTOXICIDADE DA SIDNONA SYD-1
Expected completion date	Oct 2016
Estimated size (number of pages)	120
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Anna Paula Brandt Rua Alfredo Bufren Curitiba, Paraná 80020240 Brazil Attn: Anna Paula Brandt
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

05/09/2016

RightsLink - Your Account

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 05, 2016

This Agreement between Anna Paula Brandt ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") consists of your license details and the terms and conditions provided by Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center.

License Number	3942670098487
License date	Sep 05, 2016
Licensed Content Publisher	Nature Publishing Group
Licensed Content Publication	Nature Reviews Cancer
Licensed Content Title	Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters
Licensed Content Author	Michael M. Gottesman, Tito Fojo and Susan E. Bates
Licensed Content Date	Jan 1, 2002
Licensed Content Volume Number	2
Licensed Content Issue Number	1
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figure 1: Cellular factors that cause drug resistance.
Author of this NPG article	no
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL E CITOTOXICIDADE DA SIDNONA SYD-1
Expected completion date	Oct 2016
Estimated size (number of pages)	120
Requestor Location	Anna Paula Brandt Rua Alfredo Bufren
	Curitiba, Paraná 80020240 Brazil Attn: Anna Paula Brandt
Billing Type	Invoice
Billing Address	Anna Paula Brandt Rua Alfredo Bufren
	Curitiba, Brazil 80020240 Attn: Anna Paula Brandt
Total	0.00 USD

09/09/2016

RightsLink - Your Account

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 09, 2016

This Agreement between Anna Paula Brandt ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	3944921453891
License date	Sep 09, 2016
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Cell
Licensed Content Title	Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1
Licensed Content Author	Zhidan Wu,Pere Puigserver,Ulf Andersson,Chenyu Zhang,Guillaume Adelmant,Vamsi Mootha,Amy Troy,Saverio Cinti,Bradford Lowell,Richard C. Scarpulla,Bruce M. Spiegelman
Licensed Content Date	9 July 1999
Licensed Content Volume Number	98
Licensed Content Issue Number	1
Licensed Content Pages	10
Start Page	115
End Page	124
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Português
Order reference number	
Original figure numbers	Figure 8. Pathway of mitochondrial biogenesis through PGC-1
Title of your thesis/dissertation	DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL E CITOTOXICIDADE DA SIDNONA SYD-1
Expected completion date	Oct 2016
Estimated size (number of pages)	120
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Anna Paula Brandt Rua Alfredo Bufren Curitiba, Paraná 80020240 Brazil Attn: Anna Paula Brandt
Total	0.00 USD